

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Bruna Coelho de Oliveira

**A INIBIÇÃO DA DPP-4 PREVINE A DISFUNÇÃO VASCULAR INDUZIDA
PELA HIPERATIVIDADE B-ADRENÉRGICA**

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Maio de 2018

**A INIBIÇÃO DA DPP-4 PREVINE A DISFUNÇÃO VASCULAR INDUZIDA
PELA HIPERATIVIDADE B-ADRENÉRGICA**

Bruna Coelho de Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em ____/____/____ por:

Prof.º Dr.º Valério Garrone Barauna – Orientador, UFES

Prof.º Dr.º Leonardo dos Santos – Co-orientador, UFES

Prof.ª Dr.ª Viviane de Cáceres Menezes - UFSC

Prof.º Dr.º Roger Lyrio dos Santos - UFES

Prof.ª Dr.ª Luciene Cristina Gastalho Campos – UESC

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Maio de 2018

Oliveira, Bruna Coelho 1991.

A inibição da DPP-4 previne a disfunção vascular induzida pela hiperatividade β -adrenérgica [Vitória] 2018

XVII, 91 p, 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2018)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Dr. Valério Garrone Barauna

1. Dipeptidil Peptidase 4; 2. Isoproterenol; 3. Doenças Vasculares; 4. Endotélio Vascular; 5. Inflamação.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

*A Deus e aos meus pais
Fátima e Ananias que são
meus alicerces.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente o tempo todo em minha vida, dando-me sabedoria, força e coragem para superar cada dificuldade encontrada pelo caminho.

À minha família, meus pais, minha irmã e cunhado, pela confiança depositada em mim, pelo apoio que sempre me deram e continuam dando e pelo incentivo de sempre buscar o melhor.

Aos meus amigos Victor, Vinícios, Randry, Bruna, Michely, Felipe, Diene, Rebeca e aos demais que sempre compartilharam comigo risadas, desabafos, lanches, café e descontração, tornando essa caminhada mais fácil e divertida.

Ao meu orientador Valério, pelo qual devo total gratidão pela oportunidade que foi me dada, por sempre está disponível a ajudar e pelas cobranças pensando sempre em nosso crescimento profissional. Obrigada por dedicar seu tempo investido no meu conhecimento!

Ao meu querido co-orientador e professor Leonardo, por ajudar no desenvolvimento desse estudo e pelos ensinamentos em que foi me dado.

Ao Vinicius Bermond, Marquinhos, Ananda e Eduardo por sempre estarem disponíveis em ajudar e por toda boa convivência que passamos nos laboratórios.

Ao Stephano, por ajudar nas análises de algumas amostras, que foram essenciais para esta pesquisa.

As alunas de iniciação científica, Hadassa e Rosi, por se tornarem meu “braço direito” e por ter me ajudado nas realizações dos experimentos, além da amizade.

Às queridas professoras Ana Paula e Livia, por sempre compartilharem conhecimento e dando suporte quando não era viável ao meu orientador.

Aos amigos e colegas de turma, pela companhia dessa estrada, nas disciplinas e por fazer parte dessa etapa da minha vida.

A todos os colegas e professores do LEMC por me acolherem de forma generosa.

Aos professores Silvana e Vasquez e aos colegas do laboratório, por permitir a utilização do espaço e equipamentos.

Ao LABIOM, por me permitir realizar algumas análises importantes para realização deste trabalho.

Aos funcionários da UFES, biotério, secretaria, por sempre estarem disponíveis em atender as minhas necessidades.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Sistema Nervoso Central	18
1.2. Sistema β -adrenérgico no vaso sanguíneo	19
1.3. Sistema β -adrenérgico e fatores inflamatórios	20
1.4. Dipeptidil peptidase 4	22
1.5. Dipeptidil peptidase 4 e a regulação cardiovascular	23
1.6. Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1)	23
1.7. Fator 1 derivado de células do estroma (SDF-1 α)	25
1.8. Peptídeo natriurético cerebral (BNP).....	25
1.9. Dipeptidil peptidase 4 e a inflamação.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Animais	32
3.2. Teste de esforço máximo	32
3.3. Reatividade vascular	33
3.4. Tecidos e homogenatos	35
3.5. Cultura celular	35
3.6. Atividade da enzima dipeptidil peptidase 4	36
3.7. RT-PCR de citocinas inflamatórias e colágeno	37
3.8. Hipertrofia cardíaca	38
3.9. Análise estatística	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Valores do peso corporal	41
4.2. Hipertrofia cardíaca	41
4.3. Teste de esforço máximo	43
4.4. Reatividade vascular	43
4.5. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) <i>in vivo</i>	47
4.6. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias <i>in vivo</i>	48
4.7. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) <i>in vitro</i> (CMLV)	49
4.8. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias <i>in vitro</i> (CMLV)	50

4.9. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) <i>in vitro</i> (Células endoteliais)	51
4.10. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias <i>in vitro</i> (Células endoteliais)	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS	62
8. APÊNDICE	77

RESUMO

O aumento da atividade simpática está envolvido com a gênese e a manutenção de estados patológicos que acometem o sistema cardiovascular. A hiperatividade β -adrenérgica induz a formação de fatores inflamatórios locais no tecido vascular, levando a uma disfunção vascular. Uma possível estratégia farmacológica de controlar a lesão vascular pelo processo inflamatório é inibindo a enzima dipeptidil peptidase – 4. Os inibidores da DPP-4 são da classe de fármacos utilizados para tratamento do diabetes mellitus tipo 2, por aumentar a meia-vida do GLP-1 e melhorar o controle glicêmico. Objetivamos testar a hipótese de que o inibidor de DPP-4 reverte a disfunção vascular e atenua o processo inflamatório causado pela hiperatividade β -adrenérgica. Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 300 à 350g. Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo veículo (VHC), grupo isoproterenol (agonista β -adrenérgico não seletivo) (ISO) e grupo isoproterenol mais sitagliptina (inibidor da enzima DPP-4) (ISO+SITA). Foi utilizada linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana (EAhy.926) e células musculares lisas vasculares primárias (CMLV), obtidas pelo método de explante da aorta torácica de ratos wistar. Mostramos nos nossos resultados que o isoproterenol causou hipertrofia cardíaca de 28% e a sitagliptina não foi capaz de prevenir essa resposta. Não houve alteração na função cardiorrespiratória. A inibição da DPP-4 foi capaz de prevenir o aumento da resposta contrátil à fenilefrina, além disso preveniu a disfunção endotelial causada pelo isoproterenol na reatividade vascular, observada pela remoção mecânica do endotélio. O tratamento crônico com isoproterenol não alterou a atividade da DPP-4, porém aumentou a expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (86%), IL-6 (45%) e MCP-1 (84%) na aorta, enquanto a sitagliptina reduziu para o nível basal. *In vitro*, o isoproterenol não alterou a atividade da DPP-4 e a expressão das citocinas inflamatórias nas CMLV, mas aumentou a atividade da DPP-4 e citocinas inflamatórias nas células endoteliais (IL-1 β , 49%; IL-6, 39%; MCP-1, 43%) e a sitagliptina reduziu para o nível basal. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que a inibição da DPP-4 pela sitagliptina melhora a disfunção vascular e atenua significativamente a inflamação endotelial em um modelo experimental de hiperatividade β -adrenérgica.

Palavras chaves: Dipeptidil Peptidase 4; Isoproterenol; Doenças Vasculares; Endotélio Vascular; inflamação.

ABSTRACT

The increase in sympathetic activity is involved with the genesis and maintenance of disease states that affect the cardiovascular system. β -adrenergic hyperactivity induces the formation of local inflammatory factors in vascular tissue, leading to vascular dysfunction. A possible pharmacological strategy of controlling vascular injury by the inflammatory process is to inhibit the enzyme dipeptidyl peptidase-4. DPP-4 inhibitors are of the class of drugs used to treat type 2 diabetes mellitus by increasing the half-life of GLP-1 and improve glycemic control. We aimed to test the hypothesis that the DPP-4 inhibitor reverses vascular dysfunction and attenuates the inflammatory process caused by β -adrenergic hyperactivity. Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 300 and 350g were used. The animals were randomly divided into three groups: vehicle group (VHC), isoproterenol (non-selective β -adrenergic agonist) (ISO) and isoproterenol group plus sitagliptin (DPP-4 inhibitor) (ISO + SITA). A human umbilical vein endothelial cell line (EAhy.926) and primary vascular smooth muscle cells (VSMC), obtained by the explant method of the thoracic aorta of wistar rats, were used. We have shown in our results that isoproterenol caused cardiac hypertrophy of 28% and sitagliptin was not able to prevent this response. There was no change in cardiorespiratory function. Inhibition of DPP-4 was able to prevent the increase in the contractile response to phenylephrine, in addition, it prevented the endothelial dysfunction caused by isoproterenol in vascular reactivity, observed by the mechanical removal of the endothelium. Chronic treatment with isoproterenol did not alter DPP-4 activity, but increased mRNA expression of the proinflammatory cytokines IL-1 β (86%), IL-6 (45%) and MCP-1 (84%) in the aorta, while sitagliptin reduced to baseline. In vitro, isoproterenol did not alter the activity of DPP-4 and the expression of inflammatory cytokines in VSCV, but increased the activity of DPP-4 and inflammatory cytokines in endothelial cells (IL-1 β , 49%, IL-6, 39%; MCP-1, 43%) and sitagliptin reduced to baseline. In conclusion, our study demonstrated that inhibition of DPP-4 by sitagliptin improves vascular dysfunction and significantly attenuates endothelial inflammation in an experimental model of β -adrenergic hyperactivity.

Keywords: Dipeptidyl Peptidase 4, Isoproterenol, Vascular Diseases; Endothelium, Vascular, inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos de Glicação Avançada

cAMP - 3',5' Monofosfato Cíclico de Adenosina

BNP - Peptídeo Natriurético Cerebral

Ca²⁺ – Cálcio

CCL-2 - Ligando de quimiocina do C-C

CMLV - Células

CTRL - Controle

C TB - Comprimento da Tíbia

DPP-4 - Dipeptidil peptidase 4

EDL - Extensor Longo dos Dedos

eNOS - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

ERO's - Espécies Reativas de Oxigênio

GLP-1 - Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1

cGMP - 3',5' Monofosfato Cíclico de Guanosina

Gs - Guanosina Estimulante

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-6 - Interleucina-6

IKK- β – Inibidor do fator nuclear kappa-B da subunidade beta

ISO - Isoproterenol

LPS - Lipopolissacarídeo

M – Molar

MCP-1 - Proteína Quimioatraente de Monócitos-1

MLCK - Quinase de Cadeia Leve de Miosina

NF- κ B - Fator Nuclear- κ B

NO - Óxido Nítrico

PAF - Fator de Agregação Plaquetária

PC - Peso Corporal

PKA - Proteína Quinase A

PKG - Proteína Quinase G

SDF-1 α - Fator 1 Derivado de Células Estromais

SITA - sitagliptina

SNS - Sistema Nervoso Simpático

SNP - Sistema Nervoso Parassimpático

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

VHC - Veículo

VD - Ventrículo Direito

VE - Ventrículo Esquerdo

α - Alfa

β - Beta

% - Porcentagem

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Peso corporal (g). VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA; isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA duas vias; teste *pos hoc Tukey's*; Média \pm EPM.

Figura 1: Peso cardíaco. (A) Peso do ventrículo direito, (B) Peso do ventrículo direito corrigido pelo PC, (C) Peso do ventrículo esquerdo, (D) Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo PC, (E) Peso cardíaco; (F) Peso cardíaco corrigido pelo PC. PC; peso corporal; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. Peso cardíaco, soma do ventrículo direito com ventrículo esquerdo. ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's*; * $p < 0,05$ ambos os grupos versus VHC. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

Figura: 2: Teste de tolerância ao esforço máximo. (A) Tempo até exaustão; (B) Distância total percorrida até exaustão. VHC, veículo; ISO, isoproterenol. Teste t de *Student* bilateral. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

Figura 3: Reatividade vascular realizada no LFT. (A) Curva concentração-resposta à fenilefrina. (B) Resposta máxima (R_{máx}). (C) Sensibilidade (EC₅₀). CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol. ANOVA duas vias; teste *pos hoc Bonferroni* – reatividade vascular; ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's* – R_{máx} e EC₅₀, * $p < 0,05$ ISO vs CTRL e VHC. Os valores dentro das barras e entre parênteses representam o “n” de cada grupo.

Figura 4: Efeitos da sitagliptina na reatividade vascular. Curvas de concentração-resposta para PHE. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO + SITA, isoproterenol mais sitagliptina; E⁺ (endotélio preservado). Anova duas vias; teste *pos hoc Bonferroni*. * $p < 0,05$ ISO vs grupos VHC e ISO + SITA. Os valores entre parênteses representam o “n” de cada grupo.

Figura 5: Efeitos da remoção do endotélio (E⁻) nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina (Phe). A) VHC, veículo; B) ISO, isoproterenol; C) ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA duas vias; teste *pos hoc Bonferroni*. + $p < 0,05$ versus grupo endotélio (E⁺). D) Delta da área sob a curva calculada subtraindo a média da área sob a curva do grupo com endotélio (E⁺) pareado pelo

grupo sem endotélio removido mecanicamente (E⁻); Teste t *student* bilateral; * p <0,05 ISO versus grupos VHC e ISO+SITA. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 6: Atividade da DPP-4 plasmática. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. *p<0,05 ISO+SITA vs VHC e ISO. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 7: Atividade da DPP-4 em aorta. VHC, veículo; ISO, isoproterenol. Teste t *student* bilateral. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 8. Expressão gênica de citocinas inflamatórias na aorta. A) IL-1 β , B) IL-6, C) MCP-1. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. * p <0,05 ISO versus grupos VHC e ISO+SITA. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 9: Atividade da DPP-4 em cultura celular de músculo liso vascular. A) 24h após estímulo; B) 48h após estímulo. CTRL, controle; ISO, isoproterenol; concentrações de 10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 10. Expressão gênica de citocinas inflamatórias em CMLV. A) IL-1 β , B) IL-6, C) TNF- α , D) TGF- β . CTRL, E) MCP-1. CTRL, controle; ISO, isoproterenol, concentração de 10⁻⁵M; 24h após estímulo; 48h após estímulo. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 11: Atividade da DPP-4 em cultura celular endotelial. A) 24h após estímulo; B) 48h após estímulo. CTRL, controle; ISO, isoproterenol; concentrações de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. * p <0,05 ISO versus CTRL. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Figura 12. Expressão gênica de citocinas inflamatórias em células endoteliais. A) IL-1 β , B) IL-6, C) MCP-1. CTRL, controle; ISO, isoproterenol, concentração de 10-

5M; 24h após estímulo; 48h após estímulo. ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's*. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

Figura 13: Figura esquemática. Mecanismo onde o isoproterenol causa disfunção endotelial pelo aumento da atividade da DPP-4 e citocinas pró-inflamatórias e o inibidor da DPP-4 (iDPP-4) atua prevenindo essa ação.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O aumento da atividade simpática e, conseqüentemente, os níveis de catecolaminas estão envolvidos com a gênese e a manutenção de estados patológicos que acometem o sistema cardiovascular. A hiperatividade β -adrenérgica induz a formação de fatores inflamatórios locais no tecido vascular, levando a uma disfunção vascular (FERRO et al., 1993; DAVEL et al., 2008).

Uma nova ferramenta no tratamento da disfunção e lesão vascular, pelo processo inflamatório, é a inibição da enzima dipeptidil peptidase - 4 (MATSUBARA et al., 2012; SHAH et al. 2014; STEVEN et al., 2015).

O inibidor da DPP-4 é uma classe de fármacos utilizados para tratamento do diabetes mellitus tipo 2, por aumentar a meia-vida do GLP-1 e melhorar o controle glicêmico. Os inibidores da DPP-4 aumentam os níveis de seus substratos prologando o efeito destes sobre o organismo (DICKER, 2011; AROOR et al., 2014).

1.1 Sistema Nervoso Autônomo

A excitação do sistema adrenérgico estimula a liberação de catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina, podendo ocorrer alterações comportamentais frente a uma situação de estresse e/ou medo, também conhecido como resposta de “luta e fuga” (DENNIS, 2016). O controle neural autônomo do sistema cardiovascular é regulado pelo sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP), e quando há um desequilíbrio entre esses dois sistemas, algumas patologias cardiovasculares podem ocorrer. Isto acontece quando o SNS sofre ativação excessiva concomitantemente com a supressão do SNP, causado por algumas patologias cardiovasculares como: hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, entre outras situações como diabetes e no envelhecimento, aumentando consideravelmente o risco de morbidade e mortalidade (ABBOUD, 2010).

O SNS controla a função cardíaca e vascular por meio de receptores adrenérgico do tipo alfa (α) e beta (β). Os receptores β são acoplados à proteína Gs, que ativam a adenilil-ciclase, aumentando o 3',5' monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) intracelular que conduz a ativação da proteína quinase A (PKA). Os receptores do tipo β -adrenérgicos diferem em alguns subtipos como β_1 , β_2 e β_3 . O receptor β_2 tem maior afinidade pela adrenalina, o β_3 por noradrenalina, enquanto o

β_1 tem afinidade igual pelas duas catecolaminas. O receptor β_3 possui poucos locais de ativação para a PKA e, quando ativado, tem efeito inotrópico negativo por aumentar a ativação da proteína quinase G (PKG) por meio do 3',5' monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (BRODDE e MICHEL, 1999).

No coração há predomínio de receptores β -adrenérgicos, os quais quando ativados, aumentam a PKA e a concentração de cálcio no sarcoplasma pela fosforilação dos canais de cálcio tipo L do sarcolema, o que favorece a contração. A ativação destes receptores β também promove a fosforilação da fosfolambam no retículo sarcoplasmático, ocasionando a recaptação de cálcio e contribuindo para o relaxamento cardíaco. Nas patologias com alterações da função cardíaca, como na insuficiência cardíaca, a atividade do SNS aumenta na tentativa de compensar a perda da função, porém, a estimulação β -adrenérgica mantida está relacionada à mortalidade devido a sobrecarga celular do músculo cardíaco (BRODDE e MICHEL, 1999; NAJAFI et al., 2016). Apesar dos efeitos do aumento do SNS sobre o coração estarem bem estabelecidos na literatura, pouco se sabe sobre os efeitos da hiperatividade dos receptores β -adrenérgicos sobre o sistema vascular.

1.2 Sistema β -adrenérgico no vaso sanguíneo

Nos vasos sanguíneos a ativação aguda dos receptores β -adrenérgicos (β_1 e β_2), pelas catecolaminas, induz o relaxamento do músculo liso (ORIOUO, 1995). O efeito dos receptores β -adrenérgico do subtipo β_3 pode variar em cada espécie animal (GAUTHIER et al., 2000). No entanto, sua farmacologia é bem distinta dos receptores β_1 e β_2 , sendo ativado por agonistas e bloqueado por antagonistas específico para este receptor. Na maioria dos vasos sanguíneos o receptor β_2 é predominante, embora o tipo β_1 contribua na vasodilatação e predomine em alguns vasos específicos como em artérias coronárias e cerebrais (GUIMARÃES e MOURA, 2001). Quando os receptores β são ativados no vaso, assim como no músculo cardíaco, sofrem uma alteração conformacional que em seu estado ativo se acopla às proteínas Gs, onde irão interagir com a adenilil-ciclase e liberar o segundo mensageiro cAMP que ativará a PKA e irá fosforilar diversos substratos (WERSTIUK E LEE, 2000).

O mecanismo principal de relaxamento das células musculares lisas vasculares (CMLV) é mediado pela fosforilação da quinase de cadeia leve de

miosina (MLCK) pela PKA, que inativa o MLCK por diminuir sua afinidade pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina (WERSTIUK E LEE, 2000). O cAMP também pode diminuir a concentração de cálcio intracelular no músculo liso (MCDANIEL et al., 1991) e causar hiperpolarização por ativação dos canais de potássio (REMBOLD E CHEN, 1998; TANAKA et al., 2005)

As células endoteliais vasculares também podem expressar receptores β -adrenérgicos. Esses receptores estimulam a via cAMP – PKA que aumenta o influxo de cálcio e ativam a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina. A eNOS sintetiza o óxido nítrico a partir da L-arginina e oxigênio. O NO, por ser uma molécula gasosa, se difunde para o músculo liso, aumenta a concentração de cGMP, diminui a concentração de cálcio intracelular e causa o relaxamento vascular (IRANAMI et al., 1996; CONTI et al., 2013).

1.3 Sistema β -adrenérgico e fatores inflamatórios

A exposição crônica de agonistas dos receptores β -adrenérgicos resulta em dessensibilização tanto por redução dos receptores quanto por alterações na via do cAMP (TSUJIMOTO e HOFFMAN, 1985; HAYES et al., 1986). No vaso, a hiperestimulação do sistema β -adrenérgico por administração de isoproterenol causa alteração na resposta contrátil à fenilefrina (agonista alfa 1-adrenérgico) por causar disfunção endotelial pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO's) ou pelo aumento do processo inflamatório local (DAVEL et al., 2006; DAVEL et al., 2008). A disfunção endotelial é caracterizada quando ocorre alteração no tônus do músculo liso vascular, por meio de substâncias vasoconstritoras, alteração na produção de mediadores vasodilatadores pelo endotélio ou quando as células musculares lisas diminuem a sensibilidade a esses vasodilatadores (MOMBOULI E VANHOUTTE, 1999). O aumento de ERO's também sofre reação com o óxido nítrico (NO), inativando suas propriedades anti-inflamatórias, anticoagulantes e seu efeito dilatador, ocasionando à disfunção endotelial (FUKAI e USHIO-FUKAI, 2011). Davel et al. (2006) e Krenek et al. (2006) mostraram que a administração crônica do isoproterenol aumentou os níveis das ERO's, porém aumentou também a expressão de eNOs. O aumento da expressão de eNOS pode ser uma forma compensatória, a fim de aumentar a produção e disponibilidade de NO pelo desequilíbrio ao ânion superóxido.

O excesso de espécies reativas de oxigênio resulta em aumento da expressão de citocinas, ocasionando aumento das respostas pró-inflamatórias, como adesão de monócitos, agregação plaquetária, indução de genes inflamatórios, apoptose, proliferação e migração de células do músculo liso vascular, degradação da matriz e diminuição dos fatores de relaxamento dependente de endotélio (PAPAHARALAMBUS e GRIENDLING, 2007). No coração, já se sabe que o tratamento diário com isoproterenol causa hipertrofia cardíaca como resposta ao estímulo crônico β -adrenérgico, induzindo aumento da expressão de citocinas inflamatórias local como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) (MURRAY et al., 2000).

As citocinas são moléculas de comunicação que regulam e coordenam a resposta imuno-hemostásica, desempenhando um papel essencial na comunicação célula a célula por receptores do tipo proteínas transmembranares, iniciando assim uma cascata de sinalização citoplasmática com função pleiotrópica (SCHWANTNER et al., 2004). As interleucinas IL-1 e IL-6 e o TNF- α possuem propriedades inflamatórias agudas. O TNF- α é o principal mediador da citotoxicidade contra células tumorais e possui um papel na adaptação à resposta inflamatória, com uma ampla atividade pró-inflamatória, afetando muitos tipos de células-alvo, como por exemplo, o endotélio vascular. O TNF- α induz aumento da expressão de molécula tipo fator tecidual e moléculas de adesão, promovendo a interação de leucócitos circulantes no endotélio. Ainda, estimula a liberação de interleucina-1, prostaglandina E2 e semelhantes (DIXIT et al., 1990; ZEMBALA et al., 1990). A IL-1 é produzida principalmente por monócitos, macrófagos e também por células não hematopoiéticas como as células endoteliais, quando estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). Portanto, a IL-1 tem efeito sobre o sistema vascular e sua liberação é reduzida pela produção de cAMP induzida pelas prostaglandinas. A IL-6 atua na diferenciação de linfócitos B e tem uma atividade co-estimuladora para a proliferação de células T estimuladas por mitógeno (GUPTA, 1988).

A expressão destes genes inflamatórios são regulados pelo fator nuclear- κ B (NF- κ B), uma família de fatores de transcrição, ativado em resposta a estímulos inflamatórios como o próprio TNF- α e IL-1, como também LPS, produtos de glicação avançada (AGEs), hiperglicemia, fator de agregação plaquetária (PAF), tensão de cisalhamento, lipídios oxidados, stress oxidante e hipóxia. Quando o NF- κ B é estimulado, ocorre a fosforilação da subunidade I κ B, liberando os heterodímeros

p65 e p50, permitindo sua translocação nuclear e transcrição gênica. A ativação prolongada do NF- κ B por meio de agentes estimulantes ou pelo comprometimento de mecanismos de “*downregulation*” (regulação negativa dos receptores) é características de algumas doenças crônicas inflamatórias e vasculares (MARTIN et al., 2000).

Chandrasekar et al. (2004) mostraram que a infusão contínua de isoproterenol de 1 à 72h aumenta a ativação de NF- κ B em miocárdio. Davel et. al (2008) demonstraram que o tratamento por 7 dias com o isoproterenol aumenta a reatividade vasoconstritora à fenilefrina, a expressão gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, a expressão proteica nuclear da subunidade p65 de NF- κ B e sua atividade em aortas de ratos, por stress oxidativo induzido por estimulação β -adrenérgica, pelo qual desempenha um papel importante na progressão de lesão vascular.

Morioka et al. (2013), mostraram que a ativação do receptor β -adrenérgico modula a produção de CCL2 em cultura de astrócitos espinhais, porém não há estudos que mostrem o efeito da ativação β -adrenérgica na modulação de CCL2 em vaso sanguíneo (MORIOKA et al., 2013). O CCL2 também referido como MCP-1 (proteína quimiotratante monocitária 1), é um membro da família de quimiocinas amplamente expresso em células endoteliais, células musculares lisas e monócitos em resposta a estímulos de CD40, PDGF, IL-1 β e LDL oxidado (LIM et al., 2009).

1.4 Dipeptidil peptidase – 4

A serina DPP-4 pertence à família das enzimas peptidases (enzimas que se ligam em locais específicos do seu substrato e clivam ligações peptídicas entre os aminoácidos) e que contém um sítio de ligação com um arranjo em ordem linear da tríade catalítica ácido-base-nucleófila (Ser, Asp, His) que desempenha a dupla função principal de se ligar ao substrato e catalisar a reação (HEDSTROM, 2002). Os primeiros estudos mostraram que os substratos da DPP-4 eram os que continham prolina ou alanina na penúltima posição a partir da extremidade c-terminal (carboxi-terminal) ou segunda posição a partir do N-terminal (amino-terminal). Porém, hoje se sabe que a DPP-4 também se liga em outros substratos, com menor afinidade, que contém como segundo aminoácido a partir do N-terminal

hidroxiprolina, desidroprolina, serina, glicina, valina, treonina ou leucina (LAMBEIR et al. , 2003).

A DPP-4 localiza-se na superfície celular, onde a maior parte estrutural está voltada para o espaço extracelular, capaz de estimular as vias de transdução de sinal intracelular independente de sua atividade enzimática. Além de ser conhecida como CD26, por ter sido inicialmente descoberta na superfície de timócitos e linfócitos T, a DPP-4 pode ser encontrada em diversos tecidos ou na forma solúvel (sDPP-4) circulantes nos fluidos corporais, como no sangue (HEDSTROM, 2002; LAMBEIR et al. , 2003). A contribuição da atividade da DPP-4 no endotélio capilar representa grande parte da atividade total em alguns órgãos (LOJDA, 1979). A DPP-4 está expressa também no miocárdio e no músculo estriado, nos pulmões, pâncreas, rins, intestino e fígado. (SLIMANE et al., 2000; LAMBEIR et al., 2003).

1.5 Dipeptidil peptidase – 4 e a regulação cardiovascular

A DPP-4 possui diversos substratos que podem estar envolvidos na regulação cardiovascular. Entre os mais importantes pode-se citar o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), fator 1 derivado de células do estroma (SDF-1 α) e peptídeo natriurético cerebral (BNP).

O endotélio é uma camada única de células que protege os vasos de fatores inflamatórios, de coagulação e regula o fluxo sanguíneo e pressão sanguínea (ERDOGDU et al., 2010). O comprometimento da função endotelial é uma das principais condições que contribuem para o desenvolvimento de doença vascular. A linagliptina é capaz de restaurar a disfunção endotelial causada pelo diabetes diminuindo os níveis de vasoconstritor endógeno como a endotelina, produzido pelas células endoteliais e células musculares lisas, sem alterar os níveis de glicose no sangue (YASIR, HARDIGAN, & ERGUL, 2016). Um mediador comum do relaxamento vascular é NO, liberado de células endoteliais via conversão de L-arginina pela NO sintase. A sitagliptina, além de diminuir os níveis de endotelina-1, aumenta os níveis de óxido nítrico (TANG et al., 2016). Estes estudos evidenciam que os inibidores da DPP-4 têm efeitos benéficos sobre o sistema vascular.

1.6 Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1)

A DPP-4 tem um papel importante no controle da homeostase da glicose, pois ao ser inibido, melhora a tolerância à glicose, sensibilidade e resistência à insulina e aumenta os níveis de insulina e GLP-1. O GLP-1 é um hormônio incretina sintetizado pelas células endócrinas L intestinais e secretado para corrente sanguínea em resposta à ingestão. O GLP-1 é rapidamente clivado e inativado no segundo aminoácido, alanina, localizado a partir da extremidade N-terminal pela aminopeptidase, dipeptidil peptidase 4 (DPP-4). Mais de 50 % do GLP1 é inativado antes de atingir a circulação sistêmica, com meia-vida de aproximadamente 2 minutos (DRUCKER e NAUCK, 2006; MABILLEAU et al., 2013).

O GLP-1, ao se ligar no seu receptor (GLP-1R), produz várias ações biológicas. No pâncreas, o GLP-1 estimula a liberação de insulina, inibe a secreção de glucagon e diminui a apoptose de células β -pancreáticas. Já no sistema nervoso central e periférico, os receptores de GLP-1 estão nas fibras nervosas e regulam um conjunto de função homeostática, incluindo o comportamento alimentar com diminuição do apetite, redução da motilidade gástrica e inibição da secreção de ácido gástrico. Além disso, o GLP-1 reduz a glicose plasmática, pois aumenta a captação de glicose no músculo esquelético e inibe a produção de glicose no fígado (BAGGIO e DRUCKER, 2007). O GLP-1 também é capaz de regular a função cardiovascular, pois os seus receptores são expressos em cardiomiócitos e também detectados no vaso sanguíneo em células endoteliais e musculares lisas (DAI et al., 2013; USSHER e DRUCKER, 2013).

Pela ação do controle glicêmico do GLP-1, os inibidores da DPP-4 são fármacos que foram aprovados para controle glicêmico como monoterapia para diabetes ou concomitante com a mudança de estilo de vida e outros tratamentos medicamentosos. Porém, alguns estudos têm mostrado que os inibidores da DPP-4 tem efeito protetor na função cardiovascular (DICKER, 2011) reduzindo o risco de doenças como a hipertensão, aterosclerose, acidente vascular cerebral, e doença renal crônica (AROOR et al., 2014).

Independente do seu efeito insulínico, o GLP-1 tem efeitos favoráveis direto no músculo cardíaco e vascular. No coração, o GLP-1 aumenta a captação de glicose pelo miocárdio resultando na melhora da função cardíaca. Já no sistema vascular, o GLP-1 estimula a proliferação de células endoteliais e aumenta a biodisponibilidade de NO (BHASHYAM et al., 2010; FADINI e AVOGARRO, 2011). O inibidor da DPP-4 aumenta a resposta vasodilatadora no leito vascular à acetilcolina

(vasodilatador dependente do endotélio), enquanto a resposta vascular ao nitroprussiato de sódio (vasodilatador independente do endotélio) permanece inalterada, melhorando a função endotelial em pacientes com diabetes tipo 2 (POPPEL et al., 2011). Dai et al. (2013) mostraram que o GLP-1 desempenha um papel importante na modulação do estresse oxidativo. O GLP-1 aumenta a atividade mitocondrial, a glicose intracelular e diminui a captação de glicose, o que permite uma função adequada da CMLV (MORALES et al., 2014). Este substrato também atenua a formação da neoíntima e a proliferação das CMLV induzida pela DPP-4 após lesão vascular (HIRATA et al., 2013; TERAWAKI et al., 2014).

O GLP-1 tem efeito de relaxamento NO dependente em artéria pulmonar pré-contráida com noradrenalina (GOLPON et al., 2001). Além disso, o GLP-1 tem efeitos protetores sobre as células endoteliais vasculares, aumentando a concentração de NO bioativo em consequência do aumento da atividade da eNOS por meio da fosforilação da serina 1177 pela via AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina). O análogo de GLP-1 reverte a diminuição da expressão gênica de eNOS, diminui a ativação de NF- κ B e a fosforilação de I κ B α , além de inibir o aumento da expressão gênica de moléculas de adesão celular vascular como VCAM-1, ICAM-1, E-selectina e MCP-1 causada por TNF- α (HATTORI et al., 2010).

O crescimento endotelial está envolvido no reparo da função endotelial, a fim de manter a integridade da camada íntima, e na angiogênese, um processo de neovascularização sob certas condições fisiológicas ou patológicas. O agonista de GLP-1 estimula a proliferação de células endoteliais pela via de ativação PKA-PI3K / Akt-eNOS, podendo prevenir complicações vasculares (ERDOGDU et al., 2010). O GLP-1 também tem efeito benéfico sobre a pressão arterial média e melhora a disfunção endotelial provocada pela hipertensão (YU et al., 2003).

Nystrom e colaboradores (2005) mostraram que o GLP-1 é capaz de causar relaxamento em artérias de condutância independente de NO. Green et al. (2008) demonstraram que o GLP-1 causa um relaxamento significativo em aorta de rato por meio de mecanismos que levam à estimulação de cAMP e subsequentemente abertura de canais de potássio dependente de ATP.

1.7 Fator 1 derivado de células do estroma (SDF-1 α)

Outro substrato que possui efeito sobre o sistema cardiovascular é o SDF-1 α , também conhecido como CXCL-12. O SDF-1 α é uma quimiocina de mediadores pró-inflamatórios, que atua se ligando nos receptores de quimiocina do tipo 4 (CXCR4) e do tipo 7 (CXCR7) que estão acoplados à proteína G (SIERRA et al., 2004). Esta quimiocina tem a função de induzir a migração de monócitos, linfócitos e células progenitoras hematopoiéticas para locais de inflamação e induz à angiogênese (DUTT et al., 1998). Este substrato possui prolina como segundo aminoácido a partir da extremidade N-terminal, local onde a DPP-4 atua clivando e deixando na forma inativa (SIERRA et al., 2004).

O SDF-1 α é um dos fatores pro-angiogênicos que regula a liberação das células progenitoras endoteliais (CPEs) a migrarem para a área lesionada, a partir da medula óssea, auxiliando na recuperação do endotélio, por meio da migração e proliferação de células endoteliais locais (LI et al., 2012). A DPP-4, ao ser inibida, regula positivamente o SDF-1 α plasmático e aumenta significativamente as CPEs circulantes, na qual fornecem proteção vascular por meio de reparação e neoangiogênese. (FADINI et al., 2010).

O SDF-1 é capaz de melhorar o fluxo sanguíneo e aumentar a formação de novas arteríolas após uma doença arterial periférica causada por isquemia, além de ter um papel crucial no recrutamento de células progenitoras musculares lisas derivadas da medula óssea em resposta à lesão arterial e apoptose, dando origem a células musculares lisas neointimais e resultando na reparação fisiológica do tecido após lesão (ZERNECKE et al., 2005; SEGERS et al., 2011).

1.8 Peptídeo natriurético cerebral (BNP)

Além do GLP-1 e SDF-1 α , o peptídeo natriurético cerebral (BNP) também é um substrato para a DPP-4. O BNP é um peptídeo liberado por fatores parácrinos locais quando há um aumento do estiramento da parede de átrios, ventrículos e alongamento dos miócitos, modulado por sobrecarga de pressão e volume (VANDERHEYDEN et al., 2004). Na cardiopatia, o aumento do ventrículo esquerdo está associado com a função endotelial coronária comprometida (NINOMIYA et al., 2006). O BNP possui prolina, um dos preferenciais aminoácidos da DPP-4, na segunda posição na extremidade N-terminal (BRANDT et al., 2006) e atua se ligando no receptor de peptídeo natriurético do tipo A e B (NPR-A, NPR-B). Ambos

os receptores se encontram na glândula supra-renal e rim, porém o NPR-A também é encontrado em mais abundância em grandes vasos sanguíneos e NPR-B predomina no cérebro, em particular na glândula pituitária. O BNP- liga-se preferencialmente no NPR-A que ativa o cGMP e resulta no efeito natriurético e vasodilatador (VANDERHEYDEN et al., 2004).

Nos rins, o BNP aumenta a filtração glomerular, inibe a reabsorção de sódio e água, e reduz a secreção de renina. Este efeito sobre o aumento da taxa de filtração glomerular eleva a pressão nos capilares glomerulares por meio da dilatação arteriolar aferente e constrição da arteríola eferente. O BNP inibe a reabsorção de sódio e água em todo o néfron, além disso, nos túbulos proximais renais, este substrato inibe a reabsorção de sódio e água por angiotensina II. Nas células musculares lisas, o BNP ocasiona o relaxamento independente de endotélio por atuar no NPR-A, aumentando os níveis de cGMP e ativa a proteína quinase I dependente de cGMP (PKG1), atuando nos canais de cálcio da membrana e do retículo endoplasmático, diminuindo os níveis de cálcio intracelular e a sensibilidade do sistema contrátil ao cálcio. Na insuficiência cardíaca ou no infarto agudo do miocárdio, o nível plasmático de BNP está aumentado 200 a 300 vezes mais em relação ao nível basal de um indivíduo saudável, a fim de manter a regulação da pressão sanguínea e o volume, por isso, o BNP é considerado um melhor marcador diagnóstico de insuficiência cardíaca e um preditor na vasodilatação endotélio-independente (POTTER et al., 2006).

1.9 Dipeptidil peptidase – 4 e inflamação

A ativação do SNS está associada com aumento da inflamação, onde o sistema vascular é sensível a essa anormalidade, tendo como consequência a disfunção vascular (AROOR et al., 2014). A DPP-4 além de apresentar atividade enzimática, também possui outras funções celulares, como por exemplo, ativação ou inibição de citocinas e fatores de crescimento e também controle das funções de receptores de quimiocinas e adesão celular às proteínas específicas da matriz extracelular (LAMBEIR et al., 2003).

Na lesão cardíaca, em modelo animal, a atividade da DPP-4 correlaciona-se com a quimiocina MCP-1 e sua inibição melhora significativamente a lesão do miocárdio pelo efeito anti-inflamatório da gliptina (inibidor da DPP-4), melhorando a

perfusão cardíaca e reduzindo marcadores inflamatórios (SALLES et al., 2016). Já na lesão aterosclerótica, por processo inflamatório, os inibidores da DPP-4 tem um imenso potencial terapêutico no tratamento da lesão (SINGH et. al, 2015). Ao inibir a DPP-4 reduz o acúmulo de monócitos e macrófago, suprime a proliferação de células musculares lisas e diminui a produção de TNF- α na área de lesão em parede vascular. (ERVINNA et al., 2013). O inibidor da DPP-4 reduz a expressão de citocinas inflamatórias em células endoteliais vasculares com efeito na prevenção da disfunção vascular (HWANG et al., 2015).

Está bem esclarecido na literatura que o DPP-4 modula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, bem como algumas citocinas também podem regular a expressão de DPP-4 (ERVINNA et al., 2013; SINGH et. Al, 2015; HWANG et al., 2015; SALLES et al., 2016). O exemplo disso, interleucinas, interferon- γ , fatores de transcrição, como o NF- κ B, regulam a expressão de DPP-4 em células, como linfócitos e hepatócitos (BAUVOIS et al, 1999; ERICKSON et al., 1999). Contudo, interleucina e interferon juntos podem resultar numa diminuição da atividade sérica de DPP-4 (MAES et al., 2001). Alguns estudos mostram que a enzima DPP-4 pode ser modulada em doenças cardíacas e está associada ao processo inflamatório e ao estímulo do sistema nervoso simpático continuamente aumentado (SANTOS et al., 2013; MIYOSHI et al. 2014; SALLES et al. 2015, SALLES et al. 2016). O efeito da DPP-4 na modulação da resposta inflamatória, causado pelo aumento da atividade β -adrenérgica, resultando em disfunção vascular está pouco elucidado na literatura.

Levando em consideração (1) o agravamento de doenças cardiovasculares pela ativação da via β -adrenérgica, (2) a associação do aumento da atividade da enzima DPP-4 em algumas doenças com processo inflamatório e (3) por sabermos pouco sobre o papel da DPP-4 em doenças vasculares, se faz necessário conhecer se a inibição da DPP-4 melhora a função vascular que pode ser prejudicada pela hiperatividade β -adrenérgica. Apesar de existirem alguns estudos sobre o tratamento de doenças cardíacas por meio do uso das gliptinas (inibidores da DPP-4), não se tem muitas informações sobre a inibição da DPP-4 em doenças vasculares. Nesse sentido, nossa hipótese é que a DPP-4 pode ser eficaz em melhorar o processo inflamatório e função vascular, podendo ser considerado como um potente fármaco para tratamentos clínicos em pacientes que possuem prejuízos no sistema vascular causado pela hiperatividade β -adrenérgica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Testar a hipótese de que a inibição da DPP-4 previne a disfunção vascular e atenua o processo inflamatório causado pela hiperatividade β -adrenérgica.

2.2. Objetivos específicos

I) Investigar o papel da DPP-4 na disfunção vascular induzida pela hiperatividade β -adrenérgica.

II) Estudar a modulação dos fatores inflamatórios no vaso relacionados à inibição da DPP-4 no modelo de hiperatividade β -adrenérgica.

III) Avaliar, em modelo celular, a modulação da DPP-4 pela hiperatividade β -adrenérgica.

IV) Avaliar, em modelo celular, a modulação dos fatores inflamatórios relacionados a inibição da DPP-4 no modelo de hiperatividade β -adrenérgica.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 300 à 350g. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e ração em caixas coletivas com no máximo 4 animais em cada caixa, em ambiente com temperatura (20-24 °C) e umidade controladas (40-60 %). Todos os protocolos experimentais foram aprovados e autorizados de acordo com os princípios éticos do Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal e previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo sob o número 09/2016.

Os animais foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo veículo (VHC), grupo isoproterenol (agonista β -adrenérgico não seletivo) (ISO) e grupo isoproterenol mais sitagliptina (inibidor da enzima DPP-4) (ISO+SITA). O grupo VHC recebeu volume de 0,3 mL/kg/dia de óleo de soja. O grupo ISO foi tratado na concentração de 0,4 mg/kg/dia suspenso em 0,1 mL de óleo de soja. No laboratório LFT foi incluído o grupo CTRL (ratos tratados com injeções subcutâneas de solução salina) para verificar se o óleo de soja tem efeito sobre a reatividade vascular. Todas as infusões foram feitas via subcutânea, na região dorsal próximo a nuca por 7 dias consecutivos. A sitagliptina (Merck, Kenilworth, NJ) foi administrada por gavagem (200 mg/kg; 2 vezes ao dia) simultaneamente com o tratamento com isoproterenol.

3.2. Teste de esforço máximo

O teste de esforço máximo constituiu em um teste escalonado em esteira motorizada para ratos com 6 baias individuais com altura 180 mm, largura interna 97 mm, comprimento de 385 mm (Sciencelabor, modelo SLP 033^a) por um período de seis dias, incluindo o período de adaptação. A adaptação foi realizada em cinco dias consecutivos que iniciou no segundo dia de tratamento e terminou no sexto dia. A adaptação ocorreu por um período de 10 minutos com velocidade incremental,

iniciando com velocidade de 7 metros/minutos até o tempo de 4 minutos, aumentando a velocidade para 9 metros/minutos até o tempo de 7 minutos e finalmente com velocidade de 13 metros/minutos até o tempo de 10 minutos. Após o período de adaptação e o último dia de tratamento os animais, foram submetidos ao teste de tolerância ao exercício na esteira para alcançarem o nível de esforço máximo. O teste iniciou com velocidade de 7m/min com incrementos progressivos a cada 3 minutos, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais, ou seja, a exaustão. A exaustão foi estimada como a incapacidade de locomoção do animal durante o teste e as variáveis analisadas foram o tempo total e a distância em metros percorrido por cada animal durante o teste de esforço máximo.

3.3. Reatividade vascular

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®) na dose 50 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, em seguida, eutanasiados e exanguinados. Após eutanásia, as amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da aorta abdominal e as alíquotas de plasma foram separadas por centrifugação de sangue com heparina. As amostras foram armazenadas a -80°C . A aorta torácica foi cuidadosamente removida e colocada rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado (em mM: NaCl 127; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,17; NaHCO_3 24; Glicose, 11; EDTA 0,01) aerada com mistura carbogênica contendo 5 % de CO_2 e 95 % de O_2 , em seguida foi dissecada e após remover o tecido conjuntivo foi cortada em anéis de 4 mm. Cada anel foi imerso em cuba contendo 5 mL de solução de Krebs, com pH 7,4 aquecida a $36,5^{\circ}\text{C}$ e com adição da mistura carbogênica, cuidadosamente posicionados em dois aços inoxidáveis em formato de triângulos, fixados em um gancho inferior imóvel e outro superior móvel conectado a um transdutor de força isométrica, agregado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) que está conectado a um computador. Os anéis permaneceram em repouso por 45 minutos em tensão basal de 1g, reajustada quando necessário, para estabilização.

3.3.1. Estimulo com cloreto de potássio (KCl) para avaliação da reatividade vascular

Após a estabilização por 45 minutos, os anéis foram estimulados com KCl em concentração de 75 mM para avaliar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Os anéis que não atingiram uma diferença de contração de um grama em relação ao valor basal foram excluídos. Em seguida, os anéis foram lavados com solução de Krebs por quatro vezes consecutivas, até retornar a tensão de repouso. Após 30 minutos de estabilização na tensão basal, os anéis eram estimulados novamente com a adição de KCL 75 mM nas cubas por 30 minutos, para avaliar a contração máxima do músculo liso vascular e lavados novamente quatro vezes, até atingir a tensão basal.

3.3.2. Integridade do endotélio

Após pré-contração com fenilefrina 10^{-6} M até atingir o platô, a integridade do endotélio foi qualitativamente verificada pelo grau de relaxamento (maior ou igual a 80 % de relaxamento) causado por agonista muscarínico, acetilcolina 10^{-5} M.

Os anéis que não relaxaram 80 % após acetilcolina foram descartados no grupo veículo, porém sabem-se que o isoproterenol causa disfunção endotelial, todos os anéis do grupo ISO foram considerados.

Quando necessário, o endotélio foi removido mecanicamente por atrito nas paredes internas do vaso com o auxílio de uma haste de aço. A ausência do endotélio foi considerada quando o anel relaxava até 20 % causada pela acetilcolina 10^{-5} M.

3.3.3. Efeito sobre a contração à fenilefrina em aorta com endotélio após tratamento crônico com isoproterenol e sitagliptina

Após o teste de integridade do endotélio, os anéis foram lavados quatro vezes com a solução de Krebs e estabilizado por 30 min em tensão basal. Em seguida, os anéis de aorta com endotélio foram estimulados com concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) e os mesmos foram comparados entre os ratos veículos (VHC), isoproterenol (ISO) e isoproterenol mais sitagliptina (ISO+SITA).

3.4. Tecidos e homogenatos

A artéria torácica foi removida e armazenada em -80°C para obtenção de homogenato. As aortas foram processadas e homogeneizadas, em solução tampão (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM Cloreto de magnésio, 5 mM KCl, 25 mM pH 7,5 HEPES, 1 mM PMSF, 0,1 % Triton X-100), por sonicador ultrassônico de ponteira em vatagem 10, por oito vezes durante 5 segundos em intervalos de 10 segundos em gelo. O homogenato foi centrifugado por 15 min em 1200 RCF, temperatura a 4°C e o sobrenadante foi armazenado em -80 °C.

O sangue foi colhido com punção em aorta abdominal, centrifugado por 15min em 1200 RCF, temperatura a 4°C e o plasma foi armazenado em alíquotas em -80°C.

3.5. Cultura celular

3.5.1. Células endoteliais

Linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana (EAhy.926) foi comercialmente obtidas pelo ATCC (American Type Culture Collection -ATCC, Rockville, MD). Células endoteliais (CE) foram cultivadas em meio DMEM *high glucose* suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL em uma estufa umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂. Antes de realizar os estímulos, as células endoteliais foram submetidas a um processo denominado *starving*, na qual foram mantidas em meio de cultura com menor porcentagem de FBS (0,5 %), com o objetivo de colocar todas as células na mesma fase do ciclo celular.

3.5.2. Células musculares lisas

Para extração de células musculares lisas foi utilizada a técnica de explante da aorta torácica. Após o animal ser anestesiado com tiopental sódico (Thiopentax®) na dose 50 mg/kg, por via intraperitoneal, a artéria aorta foi retirada do animal e colocada em placa de Petri contendo solução PBS + Penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL, onde foi realizada a retirada do tecido conjuntivo e a

artéria foi levada para o fluxo laminar em tubo falcon contendo PBS + Penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL. Todos os passos seguintes foram realizados dentro da capela sob condições assépticas. A aorta foi aberta longitudinalmente com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, por meio de força mecânica realizada no lúmen do vaso com uma pinça cirúrgica, foi feita a retirada da camada de células endoteliais do vaso e então a artéria foi cortada em fragmentos de aproximadamente 2 mm x 2 mm, estes fragmentos foram então colocados em uma placa de cultura de 6 poços pré-tratadas com gelatina (3 %), com a camada muscular em contato com a placa.

Os fragmentos foram mantidos em meio de cultura DMEM *high glucose* suplementado com 20 % de soro fetal bovino, Penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL e Glutamina (200 mM) em estufa umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas.

Passado cerca de sete a dez dias foi comprovado a aparição de CMLs procedentes dos explantes teciduais, as quais se aderiam ao fundo da placa em que estavam e, assim, cresciam e multiplicavam-se. Quando as células atingiam confluência aproximada de 80 %, cerca de 15 dias após a extração, as CMLs foram tripsinizadas. Para isso, as células foram lavadas 2 vezes com PBS sem cálcio (Ca²⁺) e sem magnésio (Mg²⁺), após a lavagem, foi adicionado tripsina-EDTA a 0,05 % durante 3 min na incubadora a 37 °C, com o objetivo de facilitar a suspensão das células do fundo das placas. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura DMEM+F12, 10 % FBS, Penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL e Glutamina (200 mM), as células foram semeadas em garrafas de 75 cm² e mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂. Para manter o crescimento exponencial, após atingirem 100 % de confluência, as células foram tripsinizadas e 30 % das células foram devolvidas para a garrafa. Cada tripsinização / repique, foi realizada com uma frequência média entre 4 e 7 dias.

Para realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas células sempre entre a quarta e quinta passagem.

3.6. Atividade enzimática da dipeptidil peptidase-4

A atividade da DPP-4 foi determinada seguindo o protocolo de Girardi et al., (2001) com o uso do substrato sintético (*Bachem-H-Gly-Pro-pNA · p-tosylate*).

3.6.1 Plasma e homogenatos de aorta

As amostras de plasma e homogenatos de aorta foram misturados cada um em aparelho agitador vórtex e pipetado 150 µL de amostra com 185 µL de solução tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) mais substrato (*H-Gly-Pro-pNA · p-tosylate*, 2 mM) em cada poço na placa de 96 wells. A absorbância foi determinada em medidas duplicatas ou triplicatas utilizando um leitor de microplacas Varioskan™ (emissão 405 nm) em 37°C, 25 leituras, intervalo de 2 minutos por leitura.

3.6.2 Células endoteliais e musculares lisas

As células endoteliais (EAhy.926) e CMLV foram plaqueadas a uma densidade de 65×10^4 células/well e 50×10^4 células/well, respectivamente em placas de 6-well até atingirem a confluência de 90 % e foram submetidas a *starving* por 3 horas, nas quais foram mantidas em meio de cultura com 0,5 % de FBS. As células endoteliais e CMLV foram estimuladas com concentrações moleculares de isoproterenol em 10^{-9} M à 10^{-5} M e 10^{-7} M à 10^{-4} M, respectivamente e após 24 e 48 h foram tratadas com solução PBS-cálcio + Substrato 4 mM no volume de 200 µL + acetato de sódio no volume de 500 µL. O meio foi pipetado e transferido 200 µL em cada well para uma placa de 96-wells. A absorbância foi determinada em medidas triplicatas utilizando um leitor de microplacas Varioskan™ (emissão 405 nm) em 37 °C, leitura única.

3.7. RT-PCR de citocinas inflamatórias

O RNA total dos segmentos da aorta foi isolado utilizando o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Células endoteliais (EAhy.926) e CMLV foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/well e $1,5 \times 10^4$ células/well, respectivamente em placas de 24-well até atingirem a confluência de 90 % e foram submetidas a *starving* por 3 horas, nas quais foram mantidas em meio de cultura com 0,5 % de FBS. Após a estimulação com isoproterenol e sitagliptina, o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. As

análises de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1B e IL-6) e quimiocina MCP-1 foram examinadas por RT-PCR quantitativa realizadas na Universidade de São Paulo – USP. A expressão de ciclofilina A (5'–TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAG–3';5'–GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC–3') foi utilizado como controle interno do experimento.

3.8. Hipertrofia cardíaca

Após 24h da última dose de tratamento, os ratos foram pesados, eutanasiados com dose letal de tiopental (100 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada a reatividade vascular, o sangue foi colhido com punção em aorta abdominal, o coração foi removido e dissecado em ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Os ventrículos foram pesados úmidos e foram corrigidos pela relação do peso corporal. Esta relação foi utilizada como um índice de hipertrofia ventricular.

3.9. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias \pm EPM. O 'n' ou o número nas colunas indicam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. Para estatística inferencial, o nível de significância foi estabelecido em 5%. Todos os dados foram previamente submetidos ao teste para avaliação da distribuição normal D'Agostino & Pearson.

As respostas contráteis ao KCl foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. Respostas vasoconstritoras à fenilefrina expressos como uma porcentagem da contração produzida por 75 mM KCl para cada anel. A resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e o logaritmo negativo da concentração agonista que produz 50 % da resposta máxima (EC50) foram estimados por uma análise de regressão não-linear de cada curva de concentração-resposta individual utilizando *GraphPad Prism Software* 6.0 (San Diego , CA, EUA). A comparação entre dois grupos foi realizada por teste t de *Student* não-pareado, e análise de variância ANOVA uma ou duas vias, para comparação em mais de dois grupos. Quando ANOVA apresentava significância estatística na reatividade

vascular, era realizado o *pos-hoc* de Bonferroni, nas demais análises, era realizado o *pos-hoc* de Tukey utilizando-se *GraphPad Prism Software* 6.0 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Valores do peso corporal

Na tabela 1, avaliamos o peso corporal no início e no final do tratamento com isoproterenol e sitagliptina. Observamos que os grupos VHC, ISO e ISO+SITA não apresentaram diferenças estatísticas no peso corporal após o tratamento e entre os grupos.

Peso corporal (g) no início e ao término do tratamento após 7 dias com isoproterenol e sitagliptina.

	Peso corporal (g)	
	Início	7º dia
VHC (n=08)	346,2 ± 11	374,7 ± 13
ISO (n=08)	346,3 ± 14	381,0 ± 15
ISO+SITA (n=08)	348,1 ± 09	376,6 ± 8

Tabela 1: Peso corporal (g). VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA duas vias; teste *pos hoc Tukey's*; Média ± EPM.

4.2. Hipertrofia cardíaca

A figura 1 mostra o efeito do isoproterenol no coração. Nas figuras 1A (ventrículo direito - VD), 1C (ventrículo esquerdo - VE) 1E (peso cardíaco), observamos o peso somente dos tecidos cardíacos e que o isoproterenol causou aumento do peso em relação ao grupo VHC e a sitagliptina não preveniu esse aumento; (VD, ISO: 27 %, ISO+SITA: 29 %; VE, ISO: 31 %, ISO+SITA: 27 %; peso cardíaco, ISO: 31 %; ISO+SITA: 29 %). Nas figuras 1B (ventrículo direito - VD), 1D (ventrículo esquerdo - VE) e 1F (peso cardíaco), avaliamos o efeito crônico do isoproterenol sobre o peso dos tecidos cardíacos em função do aumento do peso corporal. Observamos novamente o resultado de hipertrofia cardíaca causada pelo isoproterenol, onde a sitagliptina não preveniu (VD, ISO: 26 %, ISO+SITA: 39 %; VE,

ISO: 29 %, ISO+SITA: 27 %; peso cardíaco, ISO: 28 %; ISO+SITA: 29 %). Assim mostramos que a sitagliptina não está impedindo a ação do isoproterenol sobre a hipertrofia cardíaca.

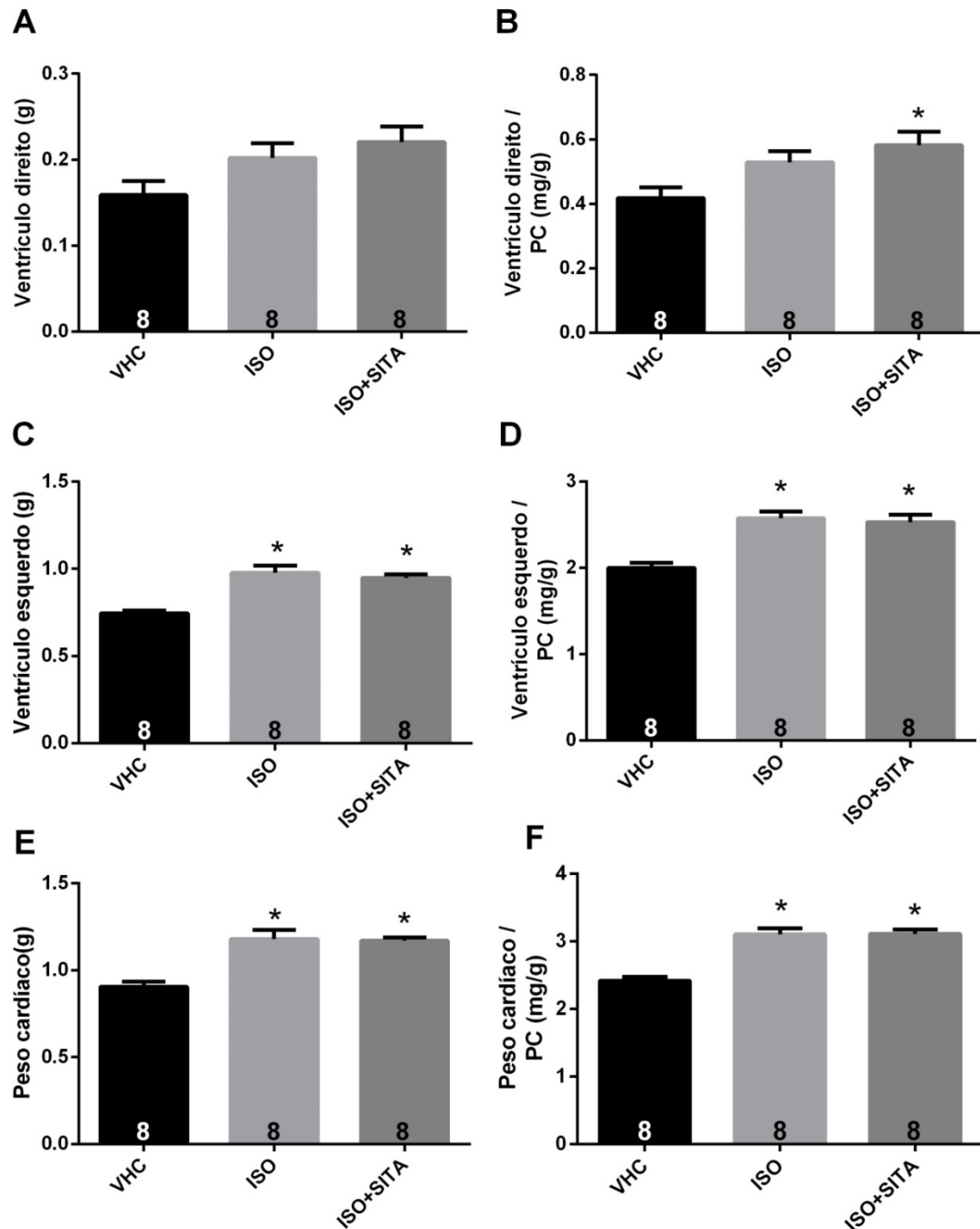


Figura 1: Peso cardíaco. (A) Peso do ventrículo direito, (B) Peso do ventrículo direito corrigido pelo PC, (C) Peso do ventrículo esquerdo, (D) Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo PC, (E) Peso cardíaco; (F) Peso cardíaco corrigido pelo PC. PC; peso corporal; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. Peso cardíaco, soma do ventrículo direito com ventrículo esquerdo.

ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's*; * $p < 0,05$ ambos os grupos versus VHC. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

4.3. Teste de esforço máximo

Na figura 2, avaliamos o efeito crônico de isoproterenol na capacidade cardiorrespiratória por meio do teste de tolerância ao esforço máximo. Apesar de resultar em hipertrofia cardíaca causada pelo isoproterenol, a estimulação crônica da via β -adrenérgica do sistema nervoso simpático não alterou a função cardiorrespiratória, observados pela ausência de diferenças estatísticas entre os grupos VHC e ISO no tempo (Figura A) e na distância percorrida (Figura 2B) até a exaustão.

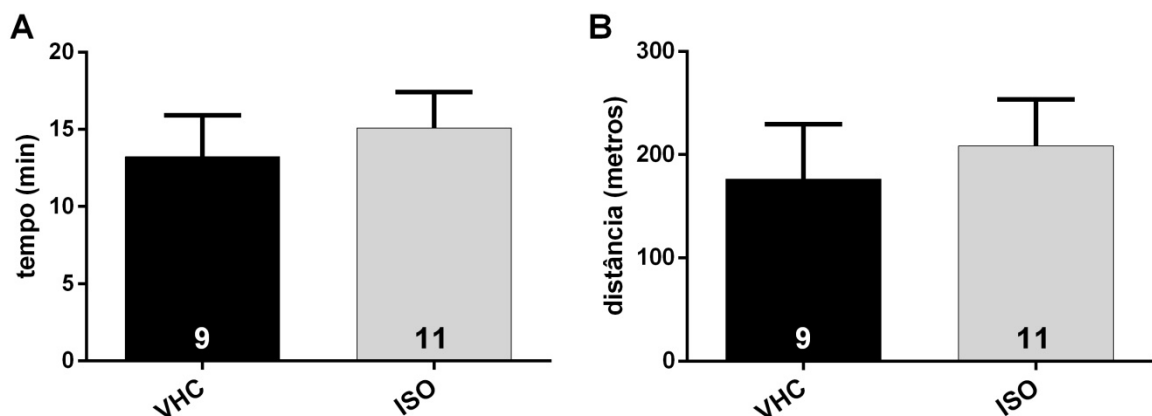


Figura: 2: Teste de tolerância ao esforço máximo. (A) Tempo até exaustão; (B) Distância total percorrida até exaustão. VHC, veículo; ISO, isoproterenol. Teste t de *Student* bilateral. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

4.4. Reatividade vascular

Para avaliarmos o efeito do inibidor da DPP-4 sobre a disfunção vascular causada pela hiperatividade β -adrenérgica, realizamos reatividade vascular à fenilefrina (agonista α_1 - adrenérgico) em ratos tratados com isoproterenol e sitagliptina. Inicialmente os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Translacional (LFT), acrescentando o grupo CTRL para verificar se o óleo

de soja do VHC também tem efeito sobre a reatividade vascular e os dados estão representados na Figura 3.

Observamos que o isoproterenol causou hiper-reatividade à fenilefrina no grupo ISO em relação aos grupos CTRL e VHC. Observamos que não houve diferença entre os grupos VHC e CTRL, portanto nos próximos experimentos não incluímos o grupo CTRL. A resposta máxima à fenilefrina no grupo ISO foi maior que a desenvolvida pelos anéis do grupo CTRL e no grupo veículo VHC (Figura 3B). Já a sensibilidade, avaliada por EC50, foi semelhante entre todos os grupos (Figura 3C).

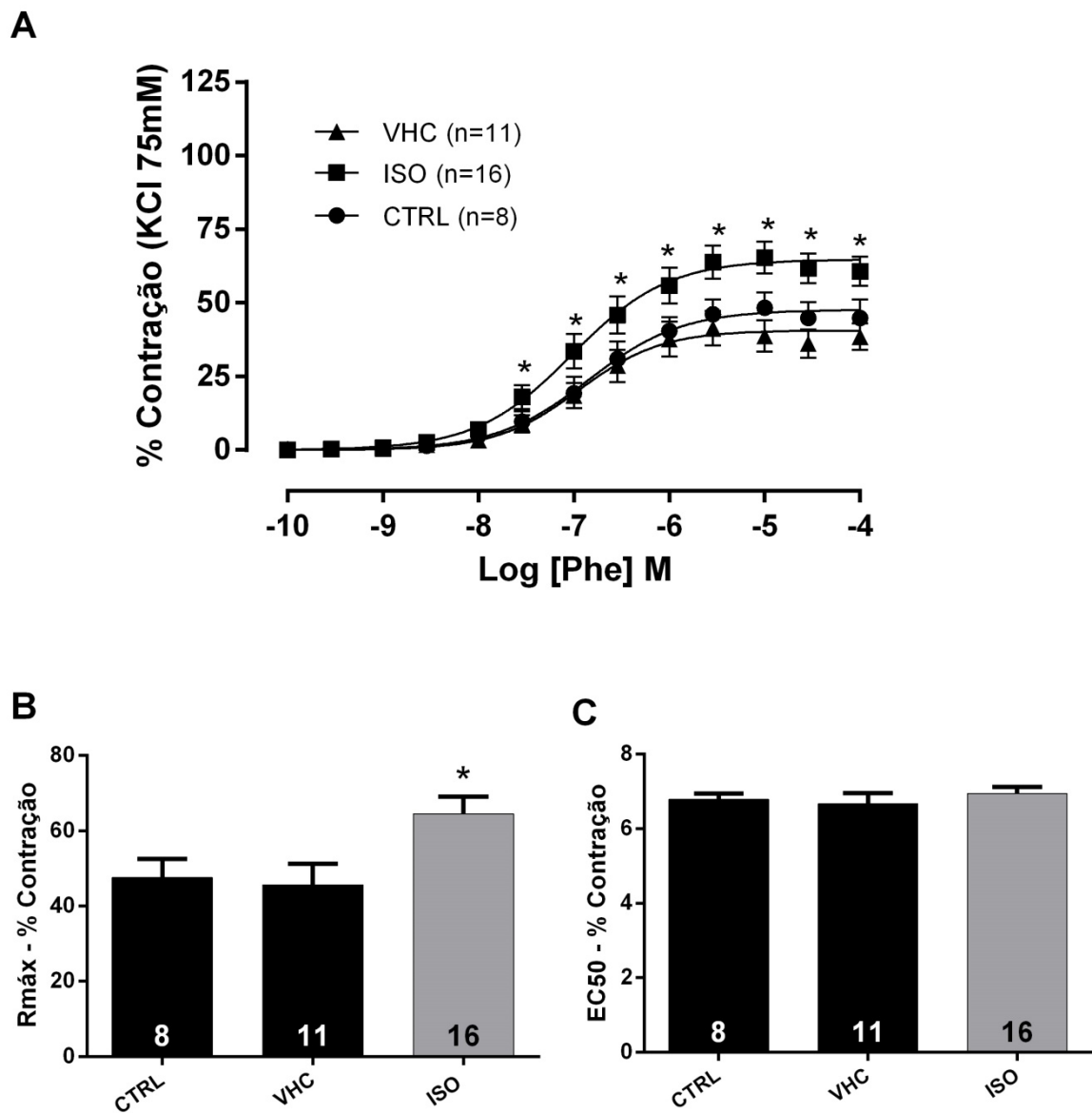


Figura 3: Reatividade vascular realizada no LFT. (A) Curva concentração-resposta à fenilefrina. (B) Resposta máxima (Rmáx). (C) Sensibilidade (EC50).

CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol. ANOVA duas vias; teste *pos hoc Bonferroni* – reatividade vascular; ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's* – R_{\max} e EC_{50} , * $p < 0,05$ ISO vs CTRL e VHC. Os valores dentro das barras e entre parênteses representam o “n” de cada grupo.

Apesar de a fenilefrina ter produzido uma contração maior no grupo ISO em relação ao CTRL e VHC, a resposta máxima estava menor em relação aos resultados encontrados na literatura (Davel et al., 2006, 2008). Nesse sentido, foi realizado um novo experimento no Laboratório de Eletromecânica cardíaca e reatividade vascular (LEMC).

Para avaliar o efeito do tratamento com inibidores da DPP-4 na função vascular, a reatividade à fenilefrina foi realizada em anéis aórticos isolados de ratos cronicamente tratados com isoproterenol (Figura 4). O tratamento com isoproterenol isolado (ISO) e concomitante com sitagliptina (ISO + SITA) não afetou a resposta contrátil ao KCl (VHC): $2,81 \pm 0,46$ g, ISO: $2,70 \pm 0,40$ g, ISO + SITA: $2,93 \pm 0,34$ g; $P > 0,05$). No entanto, o grupo ISO exibiu resposta contrátil significativamente aumentada à fenilefrina que foi impedida pela inibição da DPP-4 (Figura 4).

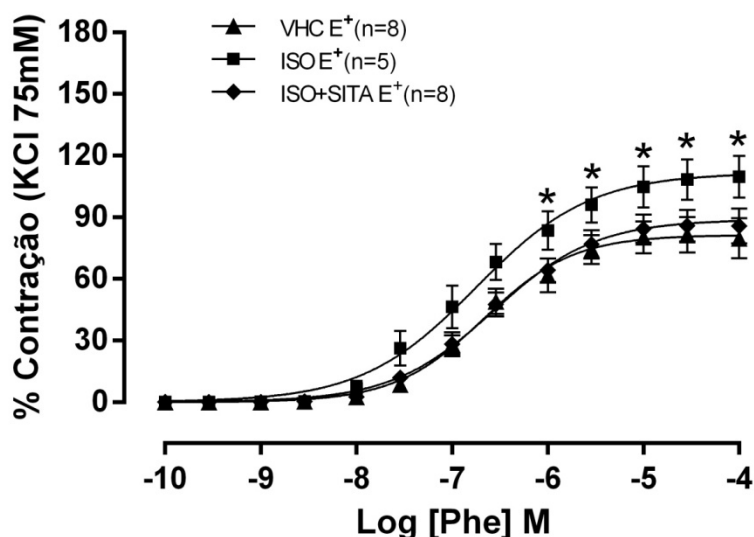


Figura 4: Efeitos da sitagliptina na reatividade vascular. Curvas de concentração-resposta para PHE. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO + SITA, isoproterenol mais sitagliptina; E⁺ (endotélio preservado). Anova duas vias; teste *pos*

hoc Bonferroni. * $p < 0,05$ ISO vs grupos VHC e ISO + SITA. Os valores entre parênteses representam o "n" de cada grupo.

A Figura 5 mostra os resultados da reatividade vascular no anel aórtico após a remoção mecânica da camada endotelial. Podemos observar que a remoção do endotélio aumentou a resposta vasoconstritora à fenilefrina no grupo VHC (Fig. 5A), porém no grupo ISO a resposta contrátil foi semelhante entre os anéis com (E^+) ou sem (E^-) o endotélio (Fig. 5B). A Figura 2C mostra que no grupo ISO + SITA houve também uma diferença significativa na resposta contrátil à fenilefrina após a remoção endotelial, mostrando que a sitagliptina preveniu a disfunção endotelial causada pelo isoproterenol. A figura 2D mostra os resultados do delta da área sob a curva.

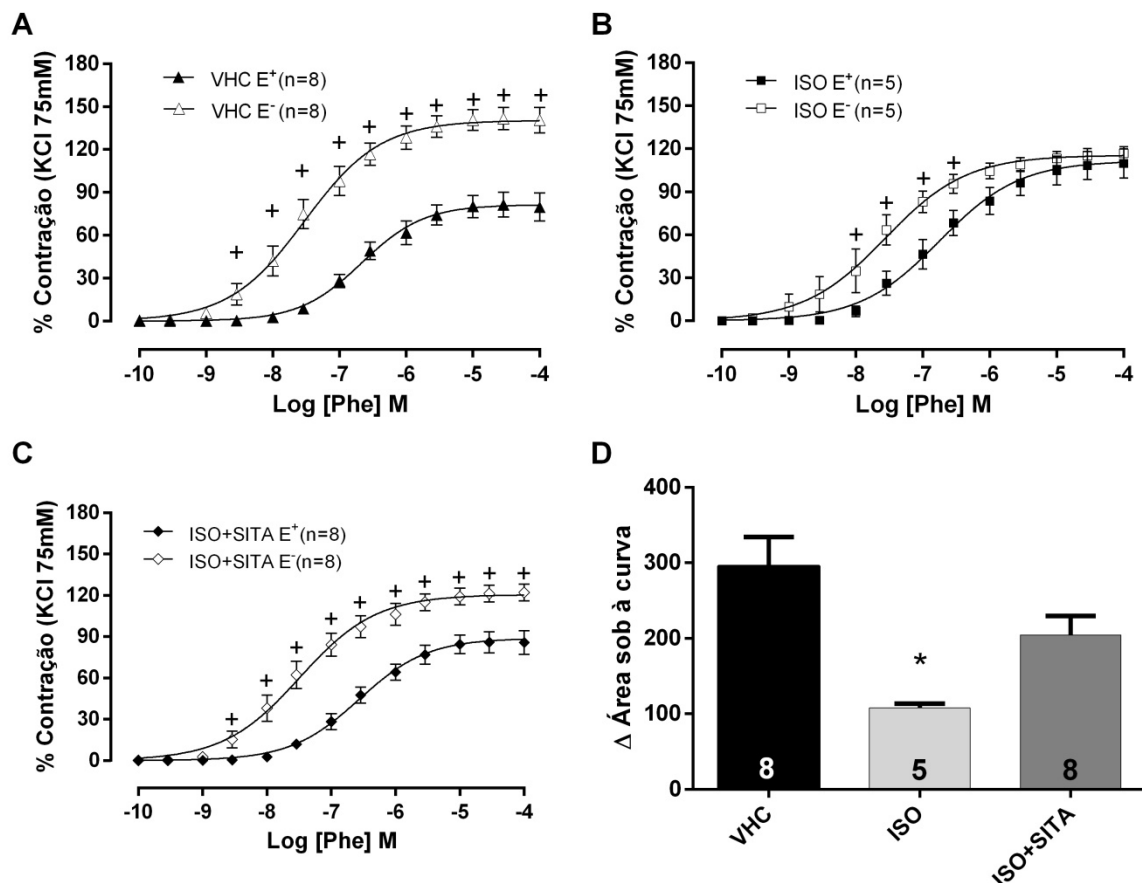


Figura 5: Efeitos da remoção do endotélio (E^-) nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina (Phe). A) VHC, veículo; B) ISO, isoproterenol; C) ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA duas vias; teste *pos hoc Bonferroni*. + $p < 0,05$ versus grupo endotélio (E^+). D) Delta da área sob a curva calculada

subtraindo a média da área sob a curva do grupo com endotélio (E^+) pareado pelo grupo sem endotélio removido mecanicamente (E^-); Teste t *student* bilateral; * $p < 0,05$ ISO versus grupos VHC e ISO+SITA. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

4.5. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) *in vivo*

Na figura 6 e 7 mostramos a atividade da DPP-4 avaliada, respectivamente, no plasma e na aorta, após tratamento crônico com isoproterenol e sitagliptina. Na figura 6 o grupo ISO não apresentou alteração na atividade plasmática da DPP-4, enquanto o tratamento com sitagliptina diminuiu a atividade da DPP-4 em 39 %.

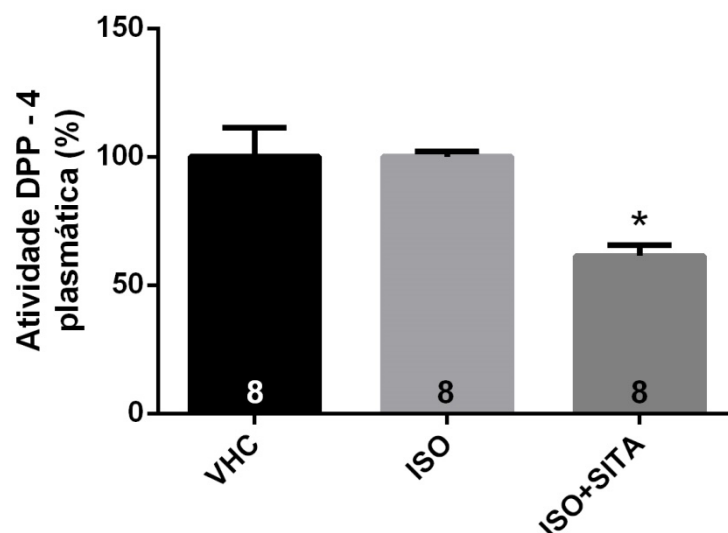


Figura 6: Atividade da DPP-4 plasmática. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. * $p < 0,05$ ISO+SITA vs VHC e ISO. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Na figura 7, analisamos a atividade da DPP-4 na aorta após tratamento crônico com isoproterenol. Observamos que a atividade da DPP-4 não apresentou diferença significativa entre os grupos.

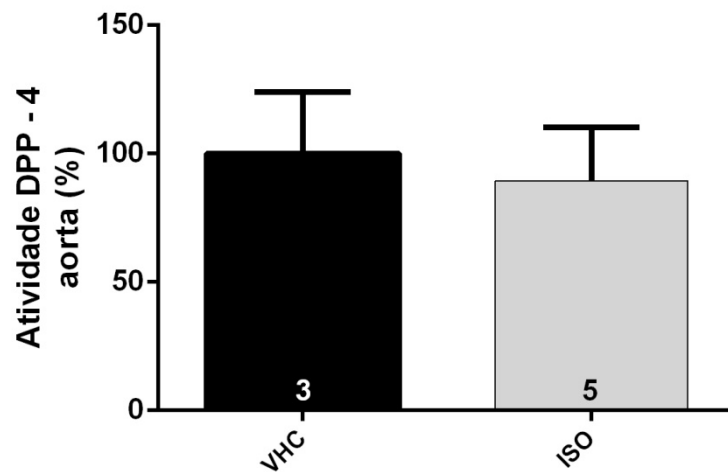


Figura 7: Atividade da DPP-4 em aorta. VHC, veículo; ISO, isoproterenol. Teste t *student* bilateral. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

4.6. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias *in vivo*

Tendo em vista que a inflamação desempenha um papel fundamental na disfunção vascular, avaliamos os níveis de marcadores inflamatórios e se o inibidor da DPP-4 tem um efeito anti-inflamatório (Figura 8). O tratamento com isoproterenol aumentou a expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (Fig. 8A, 86 %), IL-6 (Fig. 8B, 45 %) e MCP-1 (Fig. 8C, 84 %), enquanto a sitagliptina reduziu para o nível basal todas as citocinas pró-inflamatórias.

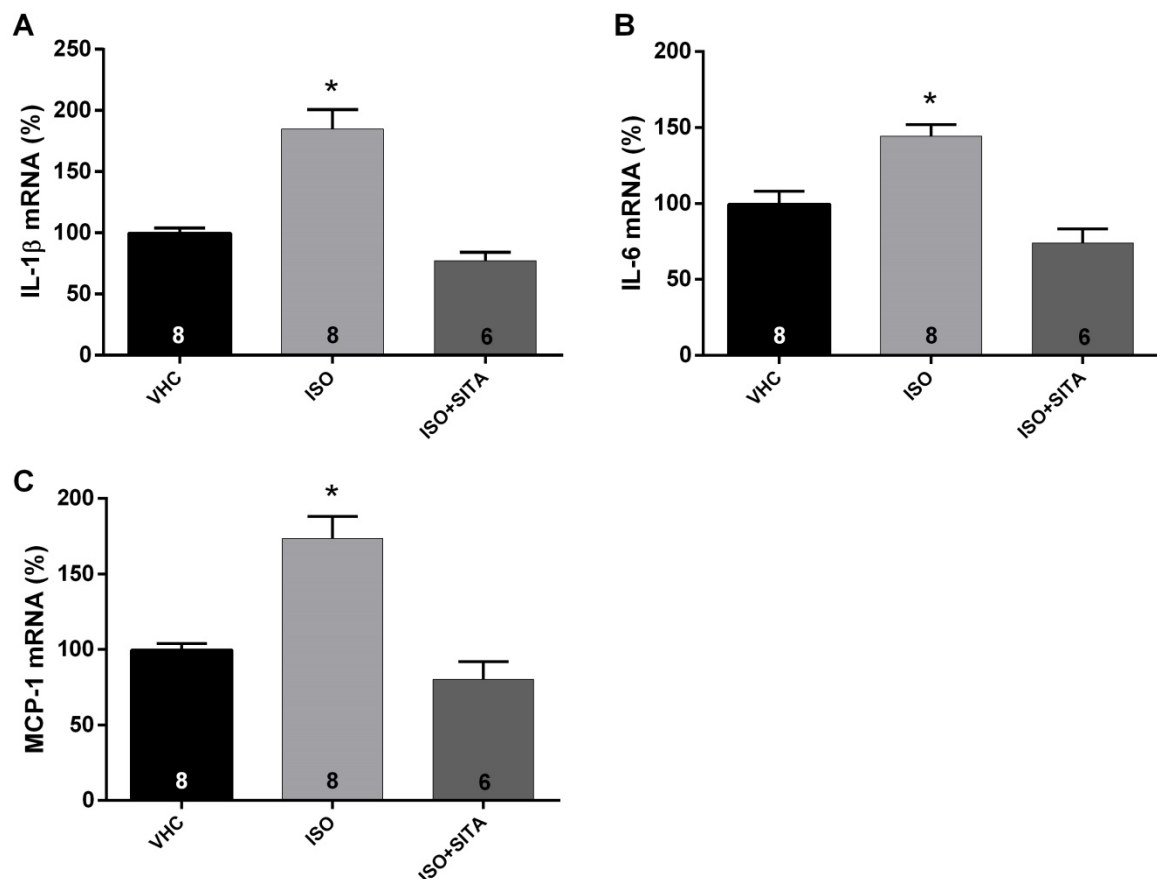


Figura 8. Expressão gênica de citocinas inflamatórias na aorta. A) IL-1 β , B) IL-6, C) MCP-1. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; ISO+SITA, isoproterenol mais sitagliptina. ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's*. * $p < 0,05$ ISO versus grupos VHC e ISO+SITA. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

4.7. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) *in vitro* (CMLV)

Na figura 9 observamos a atividade da DPP-4 *in vitro* em CMLV tratadas com isoproterenol por 24hrs (figura 9A) e 48hrs (figura 9B). Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos em diferentes concentrações de ISO (10^{-7} M a 10^{-4} M) após 24 e 48h de estímulo.

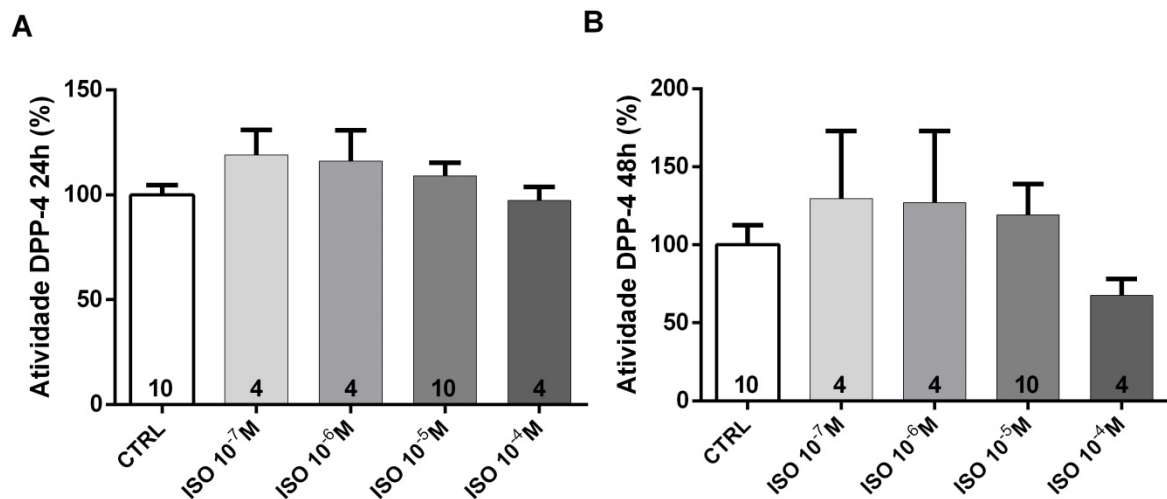


Figura 9: Atividade da DPP-4 em cultura celular de músculo liso vascular. A) 24h após estímulo; B) 48h após estímulo. CTRL, controle; ISO, isoproterenol; concentrações de 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

4.8. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias *in vitro* (CMLV)

Na figura 10, observamos o efeito do tratamento com isoproterenol sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias em CMLV. Observamos que o isoproterenol na dose 10^{-5} M não alterou a expressão das citocinas inflamatórias nas CMLV após 24hr e 48 hrs de exposição ao isoproterenol.

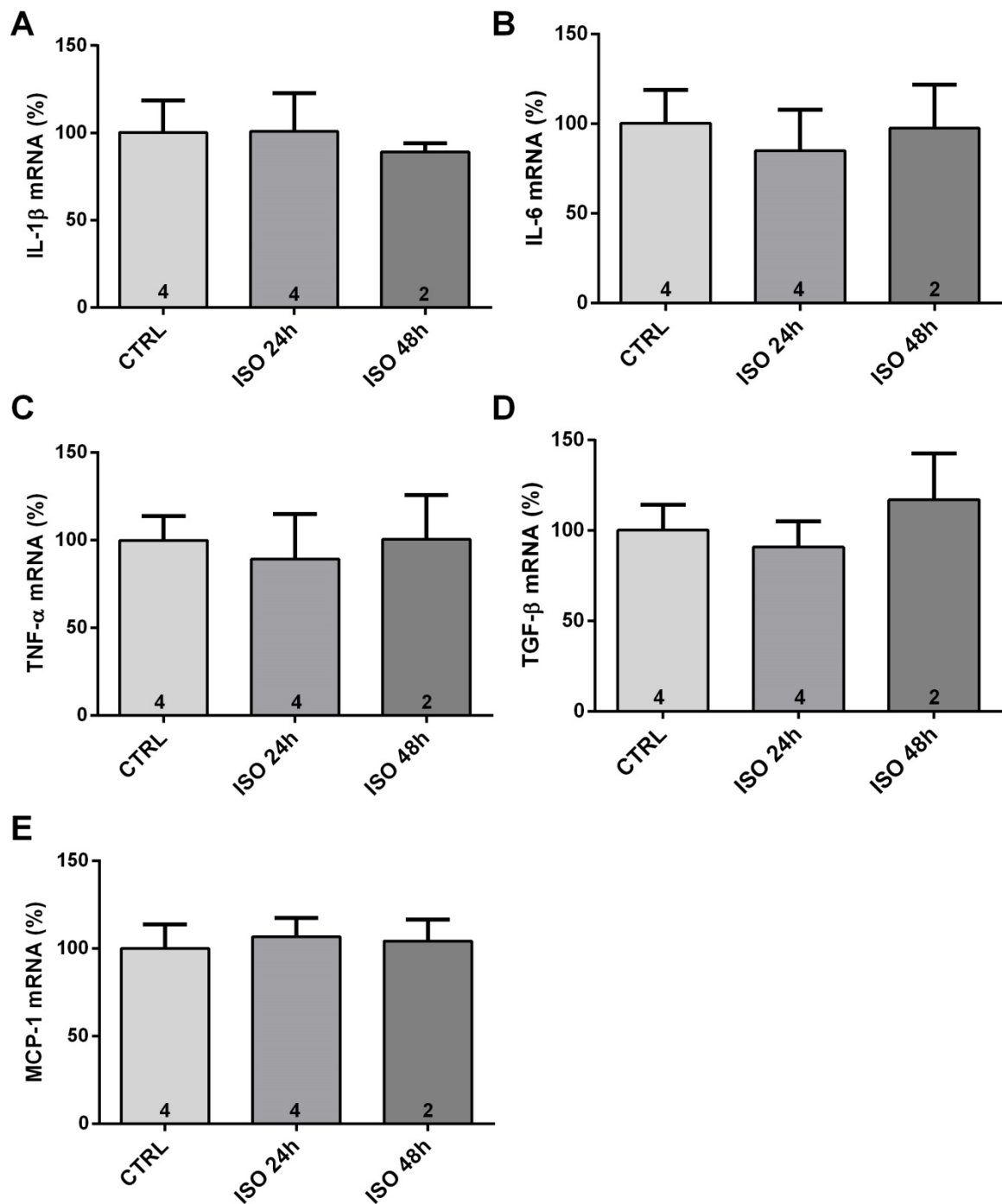


Figura 10. Expressão gênica de citocinas inflamatórias em CMLV. A) IL-1 β , B) IL-6, C) TNF- α , D) TGF- β . CTRL, E) MCP-1. CTRL, controle; ISO, isoproterenol, concentração de 10⁻⁵M; 24h após estímulo; 48h após estímulo. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

4.9. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) *in vitro* (Células endoteliais)

A Figura 11 mostra os dados obtidos em células endoteliais. Observamos que o isoproterenol aumentou a atividade da DPP-4 após 48 horas de estimulação (Fig. 11B).

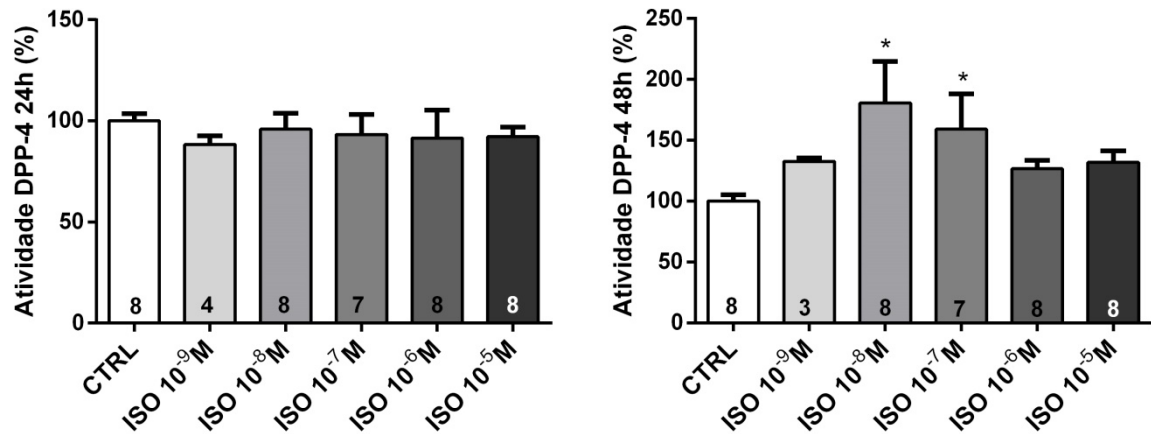


Figura 11: Atividade da DPP-4 em cultura celular endotelial. A) 24h após estímulo; B) 48h após estímulo. CTRL, controle; ISO, isoproterenol; concentrações de 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M. ANOVA uma via; teste *pos hoc* Tukey's. * p < 0,05 ISO versus CTRL. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

4.10. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias *in vitro* (Células endoteliais)

Semelhante ao observado *in vivo*, o isoproterenol aumenta as citocinas inflamatórias, (Fig. 12A IL-1 β , 49 %; Fig 5B IL-6, 39 %; Fig 5C MCP-1, 43 %, p < 0,05). A sitagliptina reduziu para o nível basal todas as expressões gênicas. Por meio destes resultados, podemos mostrar que a estimulação β -adrenérgica induziu o efeito inflamatório e que o inibidor da DPP-4 tem uma função anti-inflamatória.

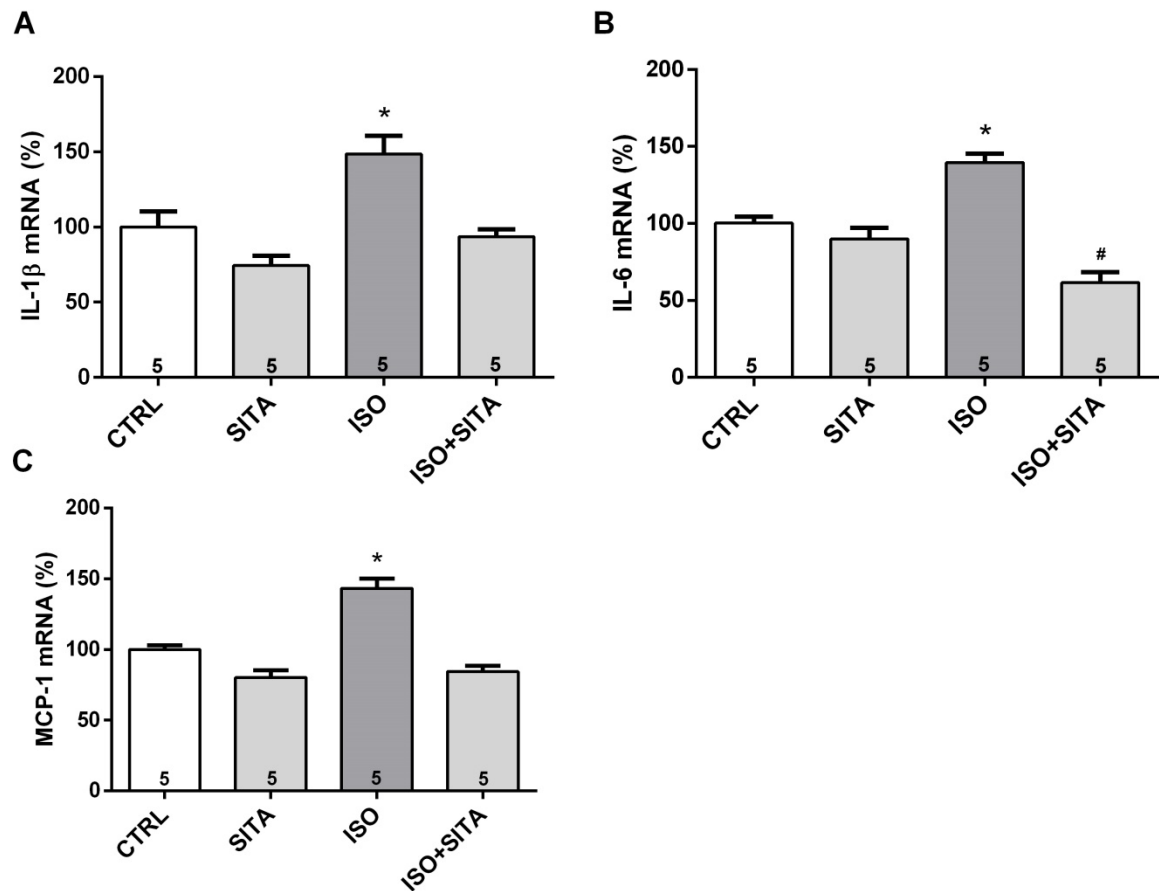


Figura 12. Expressão gênica de citocinas inflamatórias em células endoteliais.

A) IL-1 β , B) IL-6, C) MCP-1. CTRL, controle; ISO, isoproterenol, concentração de 10-5M; 24h após estímulo; 48h após estímulo. ANOVA uma via; teste *pos hoc Tukey's*. Os valores dentro das barras representam o "n" de cada grupo.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstra que o inibidor da DPP-4, a sitagliptina, melhora a função endotelial, avaliada pela hiperatividade vascular e melhora o processo inflamatório vascular, observada pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* e *in vitro* que foram comprometidos em resposta à estimulação β -adrenérgica crônica. Estes resultados mostram que as gliptinas podem atuar como hipoglicemiantes orais, como já utilizadas na clínica médica, além disso, serem eficazes também para a prevenção e tratamento de pacientes que possuem doenças vasculares acometidas pelo aumento da atividade β -adrenérgica.

Neste estudo, a inibição da DPP-4 não foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca causada pelo isoproterenol. Existem dois estudos que utilizaram o inibidor da DPP-4 em um modelo hiperatividade β -adrenérgica. Miyoshi et al. (2014) mostraram que a inibição da DPP-4 foi capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca. No entanto, eles usaram uma dose 6 vezes maior de isoproterenol, o que levou a um maior grau de hipertrofia cardíaca (38 %), enquanto a vildagliptina reduziu para 29 %. Ikeda et al. (2016) mostraram em seu estudo que a administração crônica de isoproterenol causou hipertrofia cardíaca de 28 %, enquanto a inibição da DPP-4 diminuiu a hipertrofia cardíaca para 21 %. Neste estudo, os autores usaram como inibidor da DPP-4 a saxagliptina e em nosso trabalho utilizamos a sitagliptina. Em ambos os estudos, a hipertrofia cardíaca no grupo inibidor da DPP-4 ainda era superior a 20 % em comparação ao grupo controle, semelhante ao observado em nossos dados.

O aumento da atividade simpática causa doenças cardiovasculares e aumenta o risco de mortalidade (ABBOUD, 2010). Nesta pesquisa, o tratamento com isoproterenol é capaz de causar hipertrofia cardíaca, mas não é capaz de comprometer a capacidade cardiorrespiratória, avaliada de forma indireta pelo simples teste de esforço máximo ao exercício. O teste de esforço máximo é utilizado para avaliação da aptidão cardiovascular e nos nossos resultados não observamos diferenças no tempo e na distância percorrida no grupo tratado com isoproterenol. Davel et al. (2006) mostraram que o tratamento com isoproterenol por 7 dias produziu hipertrofia ventricular direita e esquerda, mas não apresentou alterações significativas no peso corporal, na frequência cardíaca e na pressão arterial média. Estudos anteriores também mostraram que o tratamento crônico com isoproterenol

causou hipertrofia cardíaca sem apresentar alterações significativas na dinâmica cardíaca ou peso corporal (VASSALLO et al., 1988; BUSATTO et al., 1999; MURRAY et al., 2000), sugerindo que o tempo de tratamento não foi suficiente para causar insuficiência cardíaca.

Curiosamente, mostramos pela primeira vez que o tratamento com sitagliptina previne a disfunção vascular causada pelo estímulo β -adrenérgico crônico. Matsubara et al. (2012) mostraram que em camundongos com dieta hiperlipídica houve comprometimento do vasorelaxamento dependente do endotélio e quando os animais são tratados com sitagliptina, o relaxamento vascular induzido é significativamente melhorado. Bucci et al. (2004) mostraram que o relaxamento vascular dependente do endotélio induzido pela acetilcolina está fortemente comprometido em camundongos diabéticos. Vellecco et al. (2016) mostraram que após o tratamento dos camundongos diabéticos com o inibidor da DPP-4, a linagliptina foi capaz de melhorar significativamente o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina e pela isoprenalina. Shah et al. (2011b) mostraram que a inibição da DPP-4 foi capaz de induzir relaxamento vascular dependente do endotélio de segmentos da aorta independente do substrato GLP-1. Este resultado mostra que a inibição da DPP-4 pode ser uma nova estratégia terapêutica para doenças vasculares.

Atualmente o endotélio não é considerado como uma mera barreira seletivamente permeável entre a corrente sanguínea e a parede vascular e sim é reconhecido como um órgão homeostático fundamental para a regulação do tônus e da estrutura vascular (VERSARI et al., 2009). Em condições normais, a estimulação endotelial induz a produção de agentes que regulam a função vasomotora, desencadeiam processos inflamatórios e controla a homeostasia vascular. Em condições patológicas, incluindo a presença de fatores de risco cardiovascular, o endotélio sofre alterações funcionais e estruturais e perde seu papel protetor (VANHOUTTE, 1989).

O estudo aprofundado das camadas vasculares nos leva a observar que a inibição da DPP-4 previne a disfunção endotelial causada pelo isoproterenol, quando mostramos que ao retirar mecanicamente o endotélio, o grupo tratado com sitagliptina, assim como o grupo veículo, tem um aumento da reatividade vascular, diferente do grupo isoproterenol, que a resposta à fenilefrina aumenta na mesma proporção que os anéis sem retirar mecanicamente o endotélio. Shah et al. (2011a)

mostraram que a inibição da DPP-4 foi capaz de diminuir as placas ateroscleróticas com a diminuição da migração de monócitos inflamatórios e indução do relaxamento vascular dependente do endotélio dos segmentos aórticos, sugerindo que os efeitos antiinflamatórios podem mediar melhorias na função endotelial. Davel et al. (2008) mostraram que o processo inflamatório provoca disfunção endotelial, avaliada pelo aumento da expressão gênica e protéica de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, expressão da proteína nuclear da subunidade p65 do NF- κ B e sua atividade em aortas de ratos. Mais recentemente, Steven et al. (2015) mostraram que a inflamação induzida por Lipopolissacarídeos (LPS) no vaso prejudicou a função de relaxamento endotelial e que a inibição da DPP-4 também foi capaz de prevenir a inflamação vascular e o relaxamento endotelial prejudicado pelo LPS.

A DPP-4 além de está presente em alguns tecidos, também está presente nos fluídos corporais como o plasma, na forma de enzima solúvel. Alguns estudos tanto em pacientes, quanto em modelo animal, mostraram que na insuficiência cardíaca, a atividade plasmática do DPP-4 foi significativamente maior que indivíduos normais e animais controles (SANTOS et al., 2013). Como vimos anteriormente, nossos resultados não causa insuficiência cardíaca e mostramos que a estimulação crônica com isoproterenol não causa diferença significativa na atividade plasmática do DPP-4, assim como Miyoshi et al. em 2014, mostraram que após sete dias de tratamento com isoproterenol em ratos wistar não teve diferença da atividade do DPP-4 no plasma.

Nossos achados podem ter implicações importantes para o tratamento inflamatório que pode levar à disfunção endotelial, como mostramos aqui que a sitagliptina previne o aumento vascular de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1- β , MCP-1) por estimulação β -adrenérgico crônica na aorta de ratos. Murray et al. (2000) já havia mostrado que a estimulação β -adrenérgica crônica com isoproterenol levou à expressão gênica e à produção proteica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no miocárdio, sem alterar citocinas na circulação sistêmica. Miyoshi et al. (2014), mostraram que o estímulo β -adrenérgico duradouro causou aumento de citocinas inflamatórias no coração e que o inibidor da DPP-4 foi eficaz para diminuir esse processo inflamatório. A IKK β causa a ativação NF κ B por fosforilar a proteína I κ B α que quando ligada ao NF κ B, inibe sua translocação para o núcleo para iniciar a transcrição de gene pró-inflamatório (ZANDI et al., 1997). O CCR-2 é um receptor para o MCP-1, que é uma quimiocina que medeia a quimioatração de monócitos,

contribuindo para respostas inflamatórias locais (DAUGHERTY e SPRINGER, 1997). Makdissi et al. (2012) demonstraram no ser humano que a sitagliptina exerce um efeito antiinflamatório abrangente e potente. Houve uma supressão da ligação intranuclear de NFkB e a expressão de IKK β , CCR-2 e CD26 em amostra sanguínea de pessoas que receberam um tratamento com a sitagliptina em jejum. Isto é, a sitagliptina tem efeito anti-inflamatória pré-prandial, mostrando que o efeito na inflamação não tem influencia direta do GLP-1. Outros estudos como Matsubara et al. (2012) conjuntamente corroboram com nossos dados. Os autores mostraram que o tratamento com inibidor DPP-4 reduziu significativamente a expressão de IL-6, IL-1- β , TNF- α , MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1 no tecido aórtico e reduziu a lesão aterosclerótica, melhorando a disfunção endotelial em camundongos deficientes de apoE. Steven et al. (2005) mostraram que diferentes inibidores da DPP-4 tais como linagliptina, sitagliptina e liragliptina diminuíram os níveis de expressão gênica de citocinas em IL-6, TNF- α , MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1 na aorta de camundongos sépticos.

O comprometimento com a disponibilidade de óxido nítrico (NO) representa um dos principais eventos na disfunção vascular (DAVEL et al., 2006). A produção eficiente de NO é assegurada pela ativação da eNOS, mediada pela Akt. O relaxamento endotelial é mediado pelo NO, em consequência da fosforilação da eNOS pela via PI3K/Akt. Uma eNOS funcional oxida o seu substrato L-arginina, produzindo L-citrulina e NO (DUDA et al., 2004). Linardi et al. (2004) mostraram que ao inibir a eNOS por quatro semanas aumentou a atividade e expressão da DPP-4 em tecido aórtico de rato, e sugere que esse aumento ocorreu mais provavelmente ao nível do endotélio, visto que as células musculares lisas são aparentemente desprovidas dessa enzima. A atividade da DPP-4 não é alterada com o tratamento crônico com isoproterenol na aorta em nosso estudo, e sugerimos que, como também não altera nas células musculares lisas, a camada de músculo liso no homogenato mascarou o efeito do endotélio.

A inibição da DPP-4 modula a função endotelial, já que neste estudo demonstramos que o estímulo crônico com isoprotorenol aumenta a atividade da DPP-4 nas células endoteliais e a inibição da DPP-4 impede o aumento dos marcadores inflamatórios causados pela hiperestimulação β -adrenérgica. Embora os substratos relatados de DPP-4 sejam numerosos, não há estudos mostrando substratos expressos em células endoteliais (GORRELL et al., 2006; LONE et al.,

2010). Evidências recentes sugerem que os inibidores da DPP-4 podem modular diretamente a progressão inflamatória no endotélio sem o envolvimento de substratos conhecidos. Matheeußen et al. (2011) mostraram que a própria enzima DPP-4 é expressa em células endoteliais, especialmente na circulação microvascular. Um possível mecanismo é que através do domínio transmembranar e da cauda intracelular da DPP-4, a enzima modula as vias intracelulares relacionadas ao processo inflamatório e à disfunção endotelial, pois, quando inibida, aumenta a ativação das vias endoteliais e reduz a ativação de sinais pró-inflamatórios (SHAH ET AL., 2011a; HWANG et al., 2015; SHINJO et al., 2015). Hwang et al. (2015), mostraram que no tratamento de células endoteliais vasculares usando gemigliptina para inibir DPP-4, reduziu significativamente a expressão de citocinas inflamatórias induzidas por LPS, ativando AMPK e Akt e reduzindo a ativação de sinais pró-inflamatórios como NF- κ B e JNK. Outro estudo mostra que, em células endoteliais cultivadas, a alogliptina aumentou a ativação da via Akt-eNOS e induziu a liberação de NO (SHAH et al., 2011a). Assim, o resultado justifica a utilização do inibidor da DPP-4 para proteger as células endoteliais dos efeitos inflamatórios provocados pela hiperestimulação β -adrenérgica.

Em conclusão, nosso estudo demonstra claramente que a inibição da DPP-4 pela sitagliptina melhora a disfunção vascular e atenua significativamente a inflamação endotelial em um modelo experimental hiperatividade β -adrenérgica, no qual pode ser considerada com uma nova estratégia preventiva e terapêutica eficaz para diminuir o aparecimento e desenvolvimento de complicações vasculares, além do tratamento para controle glicêmico.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstra, pela primeira vez, que o inibidor da DPP-4, sitagliptina, melhora a disfunção e inflamação vascular causada pela hiperestimulação β -adrenérgica. Mostramos que esse efeito é a nível endotelial, visto que a reatividade vascular de anéis sem endotélio é melhorada em animais tratados com sitagliptina após exposição crônica ao isoproterenol, além de que a estimulação crônica β -adrenérgica não altera a atividade da DPP-4 e a expressão gênica de citocinas pró-inflamatória em células musculares lisas, mas altera em células endoteliais. A sitagliptina não é capaz de prevenir a hipertrofia cardíaca causada pelo isoproterenol, mostrando que o inibidor não impede a ação sistêmica do agonista β -adrenérgico, mas a dose utilizada é suficiente para prevenir alterações no sistema vascular, mostrando que mesmo em pequena dose já é satisfatório para prevenção de disfunção endotelial.

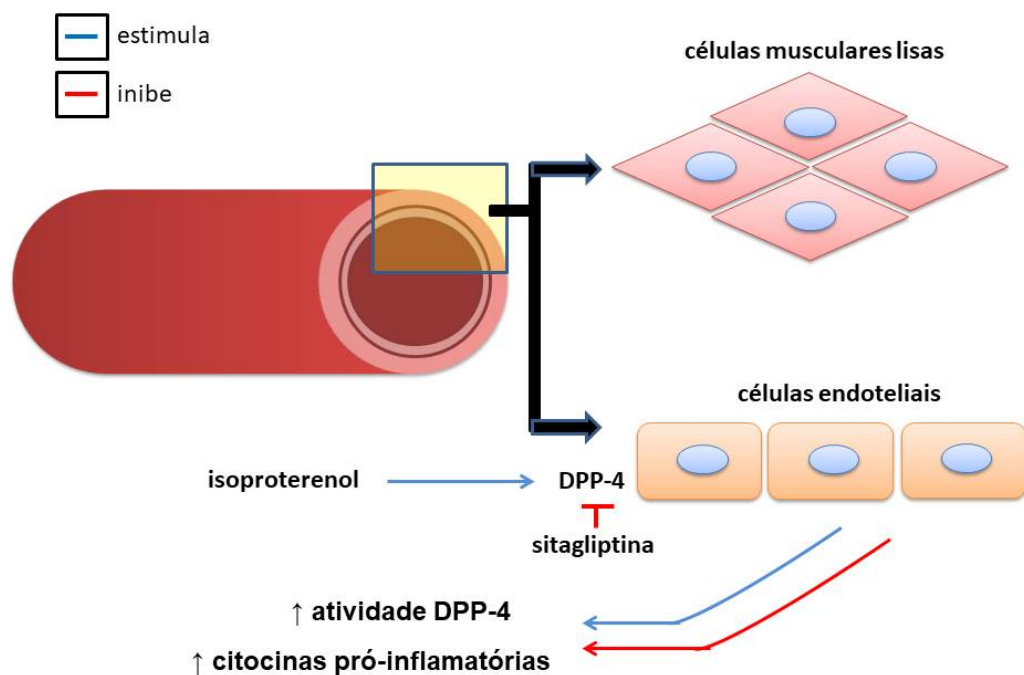


Figura 13: Figura esquemática. Mecanismo pelo qual o isoproterenol causa disfunção endotelial pelo aumento da atividade da DPP-4 e citocinas pró-inflamatórias e o inibidor da DPP-4 (iDPP-4) atua prevenindo essa ação.

Referências

7. REFERÊNCIAS

Abboud, FM. In search of autonomic balance : the good , the bad , and the ugly. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2010; 298:1449–1467.

Agrawal, S, Thakur, P, Katoch, SS. Beta Adrenoceptor Agonists, Clenbuterol, and Isoproterenol Retard Denervation Atrophy in Rat Gastrocnemius Muscle: Use of 3-Methylhistidine as a Marker of Myofibrillar Degeneration. *Japanese Journal of Physiology.* 2003; 53: 229–237.

Aroor, AR, Sowers, JR, Jia, G, Demarco, VG. Pleiotropic effects of the dipeptidylpeptidase-4 inhibitors on the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2014; 307: 477–492.

Baggio, LL e Drucker, DJ. Biology of Incretins : GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132: 2131–2157.

Bauvois, B, Djavaheiri-mergny, M, Rouillard, D, Dumont, J, Wietzerbin, J. Regulation of CD26 / DPPIV gene expression by interferons and retinoic acid in tumor B cells. *Oncogene.* 2000; 19: 265-272.

Bhashyam, S, Fields, AV, Patterson, B, Testani, JM, Chen, L, Shen, Y, Shannon, RP. Glucagon-Like Peptide-1 Increases Myocardial Glucose Uptake via p38 α MAP Kinase–Mediated, Nitric Oxide–Dependent Mechanisms in Conscious Dogs With Dilated Cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure.* 2010; 3:512-521.

Blaes, N e Boissel, J. Growth-Stimulating Effect of Catecholamines on Rat Aortic Smooth Muscle Cells in Culture. *Journal of cellular physiology.* 1983; 116:167-172.

Brandt, I, Lambeir, A, Ketelslegers, J, Vanderheyden, M, Scharpe, S, De Meester, I. Dipeptidyl-Peptidase IV Converts Intact B-Type Natriuretic Peptide into Its des-SerPro Form. *Clinical Chemistry.* 2006; 87: 82–87.

Brodde, O e Michel, M. Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. *Pharmacological Reviews*. 1999; 51: 651-689.

Bucci, M, Roviezzo, F, Brancaleone, V, Lin, MI, Di Lorenzo, A, Cicala, C, Pinto, A, Sessa, WC, Farneti, S, Fiorucci, S, Cirino, G. Diabetic Mouse Angiopathy Is Linked to Progressive Sympathetic Receptor Deletion Coupled to an Enhanced Caveolin-1 Expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004; 24:721-726.

Busatto, VCW, Cunha, V, Cicilini, MA, Mill, JG. Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999; 32: 355-360.

Chandrasekar B, Marelli-Berg, FM, Tone, M, Bysani, S, Prabhu, SD, Murray DR. β Adrenergic stimulation induces interleukin-18 expression via β 2-AR, PI3K, Akt, IKK, and NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 319: 304-311.

Clapp, BR, Hingorani, AD, Kharbanda, RK, Mohamed-ali, V, Stephens, JW, Vallance, P, Macallister, RJ. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovascular Research*. 2004; 64: 172–178.

Conti, V, Russomanno, G, Corbi, G, Izzo, V, Vecchione, C, Filippelli, A. Adrenoreceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4:1–11.

Dai, Y, Mercanti, F, Dai, D, Wang, X, Ding, Z, Venkata, N, Mehta, JL. Biochemical and Biophysical Research Communications LOX-1 , a bridge between GLP-1R and mitochondrial ROS generation in human vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 437:, 62–66.

Davel, APC, Fukuda, LE, De Sa, LL, Munhoz, CD, Scavone, C, Sanz-rosa, D, Cachofeiro, V, Lahera, V, Rossoni, LV. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. *American Journal of Physiology-Heart and*

Circulatory Physiology. 2008; 295: 211–219.

Davel, APC, Kawamoto, EM, Scavone, C, Vassallo, DV, Rossoni, LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week : a role for endothelial modulation. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 148: 629–639.

Daugherty, BL e Springer, MS. The b-Chemokine Receptor Genes CCR1 (CMKBR1), CCR2 (CMKBR2), and CCR3 (CMKBR3) Cluster within 285 kb on Human Chromosome 3p21. *Genomics*. 1997; 41: 294–295.

Delday, MI e Maltin, CA. Clenbuterol increases the expression of myogenin but not myoD in immobilized rat muscles. *American Physiological Society*. 1997; 941-944.

Dennis, RL. Adrenergic and noradrenergic regulation of poultry behavior and production. *Domestic Animal Endocrinology*. 2016; 56: 94–100.

Dicker, D. DPP-4 Inhibitors. *Diabetes care*. 2011; 34: 276–278.

Dixits, M, Rourke, O, Green, S, Sarma, V, Holzman, LB, Wolf, FW, O'Rourke, K, Ward, PA, Prochownikn, EV, Marks, RM. Tumor Necrosis Factor- α Induction of Novel Gene Products in Human Endothelial Cells Including a Macrophage-specific Chemotaxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265: 2973–2978.

Dobrian, AD, Ma, Q, Lindsay, JW, Leone, KA, Ma, K, Coben, J, Galknina, EV, Nadler, JL. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2011; 300: 410–421.

Drucker, D e Nauck, M. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *New Drug Class*. 2006; 368: 1696–1705.

Duda, DG, Fukumura, D, Jain, RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2004; 10: 143-145.

Dutt, P, Wang, J, Groopman, JE, Alerts, E. Stromal Cell-Derived Factor-1a and Stem Cell Factor/ kit Ligand Share Signaling Pathways in Hemopoietic Progenitors: A Potential Mechanism for Cooperative Induction of Chemotaxis. 2017. *The Journal of Immunology*. 1998; 161:3652-3658.

Erdogdu, O, Nathanson, D, Sjöholm, A, Nyström, T, Zhang, Q. Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; 325: 26–35.

Erickson, RH, Gum, JR, Lotterman, CD, Hicks, JW, Lai, RS, Kim, YS. Regulation of the gene for human dipeptidyl peptidase IV by hepatocyte nuclear factor 1- α . *Biochemical Journal*. 1999; 338: 91–97.

Ervinna, N, Mita, T, Yasunari, E, Azuma, K, Tanaka, R, Fujimura, S, Sukmawati, D, Nomiya, T, Kanazawa, A. Anagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Suppresses Proliferation of Vascular Smooth Muscles and Monocyte Inflammatory Reaction and Attenuates Atherosclerosis in Male apo E-Deficient Mice. *Endocrinology*. 2013; 154: 1260–1270.

Fadini, GP e Avogaro, A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition : Beyond GLP-1. *Vascular Pharmacology*. 2011; 55: 10–16.

Fadini, GP, Boscaro, E, Albiero, M, Menegazzo, L, Frison, V, Kreutzenberg, S, Agostini, C, Tiengo, A, Avogaro, A. The Oral Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Sitagliptin Increases Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33: 1607–1609.

Farag, EM, Al-Daydamony, MM, Gad, MM. What is the association between left ventricular diastolic dysfunction and 6-minute walk test in hypertensive patients?. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2017; 1-7.

Ferro, A, Kaumann, AJ, Brown, MJ. (1993). β 1- and β 2-adrenoceptor-mediated relaxation in human internal mammary artery and saphenous vein: unchanged f- and

α -adrenoceptor responsiveness after chronic β 1-adrenoceptor blockade. *British Journal of Pharmacology*. 1993; 109: 1053-1058.

Fukai, T e Ushio-fukai, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011; 15: 1583-1610.

Gauthier, C, Langin, D, Balligand, J, Gauthier, C. β 3 -Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000; 21: 426-431.

Girardi, ACC, Degray, BC, Nagy, T, Biemesderfer, D, Aronson, PT. Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276:46671-46677

Golpon, HA, Puechner, A, Welte, T, Wichert, PV, Feddersen. CO. Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7-36) amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat. *Regulatory Peptides*. 2001; 102: 81–86.

Gorrell, MD, Wang, XM, Park, J, Ajami, K, Yu, DMT, Knott, H, Seth, D, McCaughan, GW. Structure and function in dipeptidyl peptidase iv and related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2006; 575: 45-54.

Green, BD, Hand, KV, Dougan JE, McDonnell, BM, Cassidy, RS, Grieve, DJ. GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008; 478: 136–142.

Guimarães, S, Moura, D. Vascular Adrenoceptors : An Update. *Pharmacological Reviews*. 2001; 53: 319–356.

Gupta, S.Cytokines : Molecular and Biological Characteristics. *Scand J Rheumatology*. 1988; 76: 189-201.

Hattori, Y, Jojima, T, Tomizawa, A, Satoh, H, Hattori, S, Kasai, K, Hayashi, T. A

glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia*. 2010; 53: 2256–2263.

Hayes, SJ, Wyss, VL, Schenck, KS, Cohen, ML. Effects of Prolonged Isoproterenol Infusion on Cardiac and Vascular Responses to Adrenoceptor Agonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986; 237: 757-763.

Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*. 2002; 102: 4501-4523.

Hirata, Y, Kurobe, H, Nishio, C, Tanaka, K, Fukuda, D, Uematsu, E. Exendin-4, aglucagon-likepeptide-1receptoragonist, attenuates neointimal hyperplasia after vascularinjury. *European Journal of Pharmacology*. 2012; 699: 106–111.

Hwang, H, Soo, H, Woo, T, Young, J, Cheol, H, Hyun, S, Jin, H. The dipeptidyl peptidase-IV inhibitor inhibits the expression of vascular adhesion molecules and inflammatory cytokines in HUVECs via Akt- and AMPK-dependent mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015; 405: 25–34.

Ikeda, J, Kimoto, N, Kitayama, T, Kunori, S. Cardiac DPP-4 inhibition by saxagliptin ameliorates isoproterenol-induced myocardial remodeling and cardiac diastolic dysfunction in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2016; 132: 65-70.

Iranami, H, Hatano, Y, Tsukiyama, Y, Maeda, H, Mizumoto, K. A Beta-adrenoceptor Agonist Evokes A Nitric Oxide-cGMP Relaxation Mechanism Modulated by Adenylyl Cyclase in Rat Aorta. *Anesthesiology*. 1996; 85: 1129-1138.

Krenek, P, Klimas, J, Krosiakova, M, Gazova, A, Plandorova, J, Kucerova, D, Fecenikova, A, Svec, P, Kyselovic, J. Increased expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in the aorta of rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006; 84: 1245-1250.

Lambeir, A, Durinx, C, Scharpé, S. Dipeptidyl-Peptidase IV from Bench to Bedside : An Update on Structural Properties , Functions , and Clinical Aspects of the Enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2013; 40: 209–294.

Li, FYL, Lam, KSL, Tse, HF, Chen, C, Wang, Y, Vanhoutte, PM, Xu, A. Endothelium-Selective Activation of AMP-Activated Protein Kinase Prevents Diabetes Mellitus–Induced Impairment in Vascular Function and Reendothelialization via Induction of Heme Oxygenase-1 in Mice. *Circulation*. 2012; 126: 1267-1277.

Lim, JH, Um, HJ, Park, JW, Lee, IK, Kwon, TK. Interleukin-1 β promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human aorta smooth muscle cells via multiple signaling pathways. *Experimental and Molecular Medicine*. 2009; 41: 757-764.

Linardi, A, Panunto PC, Ferro ES, Hyslop S. Peptidase Activities In Rats Treated Chronically With N ω - Nitro-L-arginine Methyl Ester (l-name). *Biochemical Pharmacology*. 2004;15: 205-14.

Lojda, Z. Studies on Dipeptidyl (Amino) Peptidase IV (Glyeyl-Proline Naphthylamidase). *Histochemistry*. 1979; 59: 153–166.

Lone, AM, Nolte, WM, Tinoco, AD, Saghatelian, A. Peptidomics of the Prolyl Peptidases. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2010; 483-491.

Lynch, GS, Hinkle, RT, Faulkner, J. Year-long clenbuterol treatment of mice increases mass, but not specific force, or normalized power, of skeletal muscles. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1999; 26: 117-120.

Mabilleau, G, Mieczkowska, A, Irwin, N, Flatt, PR, Chappard, D. Optimal bone mechanical and material properties require a functional glucagon-like peptide-1 receptor. *Journal of Endocrinology*. 2013; 219: 59–68.

Maes, M, Capuron, L, Ravaud, A, Guald, N, Bosmans, E, Egyed, B, Dantzer, R, Neveu, PJ. Lowered Serum Dipeptidyl Peptidase IV Activity is Associated with

Depressive Symptoms and Cytokine Production in Cancer Patients Receiving Interleukin-2-Based Immunotherapy. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24:130-140.

Makdissi, A, Ghanim, H, Vora, M, Green, K, Abuaysheh, S, Chaudhuri, A, Dhindsa, S, Dandona, P. Sitagliptin Exerts an Antinflammatory Action. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012; 97: 3333–3341.

Martin, R, Hoeth, M, Hofer-warbinek, R, Schmid, JA. Vascular Biology The Transcription Factor NF- κ B and the Regulation of Vascular Cell Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000; 20: 83-88.

Matheeußen, V, Baerts, L, De Meyer, G, De Keulenaer, G, Veken, PV, Augustyns, K, Dubois, V, Scharpe, S, De Meester, I. Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011. 392: 189–198.

Matsubara, J, Sugiyama, S, Sugamura, K, Nakamura, T, Fujiwara, Y, Akiyama, E, Kurokawa, H, Nozaki, T, Ohba, K, Konishi, M, Maeda, H, Izumiya, Y, Kaikita, K, Sumida, H, Jinnouchi, H, Matsui, K, Kim-Mitsuyama, S, Takeya, M, Ogawa, H. A Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Des-Fluoro-Sitagliptin, Improves Endothelial Function and Reduces Atherosclerotic Lesion Formation in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012; 59: 265-276.

Mcdaniel, NL, Rembold, CM, Richard, HM, Murphy, RA. Cyclic amp relaxes swine arterial smooth muscle predominantly by decreasing cell ca^{2+} concentration. *Journal of Physiology*. 1991; 439: 147–160.

Miyoshi, T, Nakamura, K, Yoshida, M, Miura, D, Oe, H, Akagi, S, Sugiyama, H, Akazawa, K, Yonezawa T, Wada, J, Ito, H. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats. *Cardiovascular Diabetology*. 2014; 13: 1-10.

Mombouli, JV e Vanhoutte, PM. Endothelial Dysfunction: From Physiology to Therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1999; 31: 61–74.

Morioka, N, Abe, H, Araki, R, Matsumoto, N, Zhang, FF, Nakamura, Y, Hisaoka-Nakashima, K, Nakata, Y. A $\beta_1/2$ Adrenergic Receptor-Sensitive Intracellular Signaling Pathway Modulates CCL2 Production in Cultured Spinal Astrocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 2014; 229: 323–332.

Morales, PE, Torres, G, Sotomayor-flores, C, Peña-oyar.zún, D, Rivera-mejías, P, Paredes, F, Chiong, M. GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum – mitochondria coupling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 446: 410–416.

Murray, DR, Prabhu, SD, Chandrasekar, B. Chronic β -Adrenergic Stimulation Induces Myocardial Proinflammatory Cytokine Expression. *Circulation*. 2000; 101: 2338-2341.

Najafi, A, Sequeira, V, Kuster, DWD, Velden, JVD. β -adrenergic receptor signaling and its functional consequences in the diseased heart. *European Journal of Clinical Investigation*. 2016; 46: 362–374.

Ninomiya, Y, Hamasaki, S, Ishida, S, Kataoka, T, Saihara, K, Okui, H, Orihara, K, Fukudome, T, Shinsato, T, Ichiki, T, Mizoguchi, E, Otsuji, Y, Tei, C. Elevated Levels of Brain Natriuretic Peptide as a Predictor of Impaired Coronary Endothelial Function in Patients With Left Ventricular Remodeling. *Journal of Cardiology*. 2006; 48: 125-132.

Nyström, T, Gonon, AT, Sjfhholm, A, Pernow, J. Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regulatory Peptides*. 2005; 125: 173– 177.

Oriowo, MA. Different Atypical B-Adrenoceptors Mediate Isoprenaline induced Relaxation In Vascular And Non Vascular Smooth Muscles. *Life Sciences*. 1995; 56: 269–275.

Papaharalambus, C.A e Griendling, KK. Basic Mechanisms of Oxidative Stress and

Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2007; 17:48–54.

Poppel, PCMV, Netea, MG, Smits, P, Tack, C. Vildagliptin Improves Endothelium-Dependent Vasodilatation in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34: 2072–2077.
Potter, LR, Abbey-hosch, S, Dickey, DM. Natriuretic Peptides , Their Receptors , and Cyclic. *Endocrine Reviews*. 2005; 27: 47–72.

Potter, LR, Abbey-Hosch, S, Dickey, DM. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocrine Reviews*. 2006; 27:47–72.

Rembold, CM, Chen, X. Mechanisms Responsible for Forskolin-Induced Relaxation of Rat Tail Artery. *Hypertension*. 1998; 31:872-877.

Salles, TA, Santos, L, Barauna, VG, Girardi, ACC. Potential Role of Dipeptidyl Peptidase IV in the Pathophysiology of Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 4226-4249.

Salles, TDA, Zogbi, C, Lima, TM, Carneiro, CG, Garcez, AT, Barbeiro, HV, Luiz Antonio, E, Santos, L, Pereira, AC, Tucci, PJF, Faria, DP, Soriano, FG, Girardi, ACC. The contributions of dipeptidyl peptidase IV to inflammation in heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2016; 310:1760–1772.

Santos, L, Salles, TA, Arruda-junior, DF, Campos, LCG, Pereira, AC, Barreto, ALT, Antonio, EL, Mansur, AJ, Tucci, PJF, Krieger, JE, Girardi, ACC. Circulating Dipeptidyl Peptidase IV Activity Correlates Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*. 2013; 6: 1029-1038.

Schwantner, A, Dingley, AJ, Özbek, S, Rose-john, S, Grötzinger, J. Direct Determination of the Interleukin-6 Binding Epitope of the Interleukin-6 Receptor by NMR Spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 571–576.

Segers, VFM, Revin, V, Wu, W, Qiu, H, Yan, Z, Lee, RT, Sandrasagra, A. Protease-

Resistant Stromal Cell – Derived Factor-1 for the Treatment of Experimental Peripheral Artery Disease. *Circulation*. 2011; 123: 1306-1315.

Shah, Z, Kampfrath, T, Deiuliis, JA, Zhong, J, Pineda, C, Ying, Z, Xu, X, Lu, B, Moffatt-Bruce, S, Durairaj, R, Sun, Q, Mihai, G, Maiseyeu, A, Rajagopalan, S. Chronic DPP-4 Inhibition Reduces Atherosclerosis and Inflammation via Effects on Monocyte Recruitment and Chemotaxis. *Circulation*. 2011a; 22: 2338–2349.

Shah, Z, Pineda, C, Kampfrath, T, Maiseyeu, A, Ying, Z, Racoma, I, Deiuliis, J, Xu, X, Sun, Q, Moffatt-Bruce, S, Villamena, F, Rajagopalan, S. Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascular Pharmacology*. 2011b; 55: 2–9.

Shinjo, T, Nakatsu, Y, Iwashita, M, Sano, T, Sakoda, H, Ishihara, H, Kushiya, A, Fujishiro, M, Fukushima, T, Tsuchiya, Y, Kamata, H, Nishimura, F, Asano T. DPP-IV inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- κ B activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015; 309: 214–223.

Sierra, MLL, Yang, F, Narazaki, M, Salvucci, O, Davis, D, Yarchoan, R, Zhang, HH, Fales, H, Tosato, G. Differential processing of stromal-derived factor-1 α and stromal-derived factor-1 β explains functional diversity. *Blood*. 2004; 103: 2452–2460.

Singh, TP, Vangaveti, VN, Malabu, UH. Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & Reviews Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and their potential role in the management of atherosclerosis — A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2015; 9: 223–229.

Slimane, TA, Lenoir, C, Sapin, C, Maurice, M, Trugnan, G. Apical Secretion and Sialylation of Soluble Dipeptidyl Peptidase IV Are Two Related Events. *Experimental Cell Research*. 2000; 258: 184–194.

Steven, S, Hausding, M, Kro"ller-Scho"n, S, Mader, M, Mikhed, Y, Stamm, P, Zinßius, E, Pfeffer, A, Welschof, P, Agdauletova, S, Sudowe, S, Li, H, Oelze, M,

Schulz, E, Klein, T, Münzel, T, Daiber, A. Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation / dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Research in Cardiology*. 2015; 110: 1-14.

Tanaka, Y, Horinouchi, T, Koike, K. New Insights Into B-Adrenoceptors In Smooth Muscle : Distribution Of Receptor Subtypes And Molecular Mechanisms Triggering Muscle Relaxation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2005; 32: 503–514.

Tang, ST, Su, H, Zhang, Q, Tang HQ, Wang, CJ, Zhou, Q, Wei, W, Zhu, HQ, Wang, Y. Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor- κ B/I κ B α system through the activation of AMP-activated protein kinase. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016; 37: 1558-1566.

Terawaki, Y, Nomiya, T, Kawanami, T, Hamaguchi, Y, Takahashi, H, Tanaka, T. Murase, K, Nagaishi, Tanabe, M, Yanase, T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates neointima formation after vascular injury. *Cardiovascular Diabetology*. 2014; 13:154.

Tsujimoto, G e Hoffman, BB. Desensitization of β -Adrenergic Receptor-Mediated Vascular Smooth Muscle Relaxation. *Molecular Pharmacology*, 1984; 27:210-217.

Ussher, JR e Drucker, DJ. Cardiovascular Biology of the Incretin System. *Endocrine Reviews*. 2012; 33: 187–215.

Vanderheyden, M, Bartunek, J, Goethals, M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *The European Journal of Heart Failure*. 2004; 6: 261–268.

Vanhoutte, PM. Endothelium and Control of Vascular Function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989; 13: 658-67.

Vassallo, DV, Vasquez, EC, Cabral, AM. Contractile performance of papillary

muscles of renovascular hypertensive and isoproterenol-pretreated rats. *Pharmacological Research Communications*. 1998; 20: 61-72.

Vellecco, V, Mitidieri, E, Gargiulo, A, Brancaleone, V, Matassa, D, Klein, T, Esposito, F, Cirino, G, Bucci, M. Vascular effects of linagliptin in non-obese diabetic mice are glucose-independent and involve positive modulation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/caveolin-1 (CAV-1) pathway. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016; 18: 1236–1243.

Versari, D, Daghini, E, Viridis, A, Ghiadoni, L, Taddei, S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 157: 527–536.

Werstiuk, ES e Lee, RMKW. Vascular -adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2000; 78: 33–452.

Yasir, A, Hardigan, T, Ergul, A. Diabetes-mediated middle cerebral artery remodeling is restored by linagliptin: Interaction with the vascular smooth muscle cell endothelin system. *Life Sciences*. 2016; 159: 76–82.

Yu, M, Moreno, C, Hoagland, KM, Dahly, A, Ditter, K, Mistry, M, Roman, JR. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension*. 2003; 21: 1125–1135.

Zandi, E, Rothwarf, DM, Delhase, M, Hayakawa, M, Karin, M. The I κ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK α and IKK β , Necessary for I κ B Phosphorylation and NF- κ B Activation. *Cell*. 1997; 91: 243–252.

Zembala, M, Kowalczyk, D, Pryjma, J, Ruggiero, I, Mytar, B, Klysik, J, Stec, WJ. The role of tumor necrosis factor in the regulation of antigen presentation by human monocytes. *International Immunology*. 1990; 2: 337-342.

Zeng, Y, Li, C, Guan, M, Zheng, Z, Li, J, Xu, W, Wang, L, He, F, Xue, Y. The DPP-4 inhibitor sitagliptin attenuates the progress of atherosclerosis in apolipoprotein

Eknockout mice via AMPK- and MAPK-dependent mechanisms. *Cardiovascular Diabetology*. 2014; 13: 1–10.

Zernecke, A, Schober, A, Bot, I, Hundelshausen, PV, Liehn, Mopps, B, EA, Mericskay, M, Gierschik, P, Biessen, EA, Weber, C. Hyperplasia and Recruitment of Smooth Muscle Progenitor Cells. *Circulation Research*. 2005; 96:784-791

Apêndice

8. APÊNDICE

8.1. Diluição do isoproterenol

8.1.1 Metodologia

Para mimetizar a hiperatividade β -adrenérgica, utilizamos o isoproterenol (um agonista não-seletivo para receptores β -adrenérgico). Inicialmente, foi escolhida a concentração de isoproterenol de acordo com a literatura a fim de causar disfunção vascular e hipertrofia cardíaca (DAVEL et al., 2008; DAVEL et al., 2006). A hipertrofia cardíaca é o parâmetro de efeito crônico do isoproterenol. Definimos a concentração de 0,4 mg/kg/dia, administrada através de óleo de soja tratados por 7 dias. Para montar o protocolo para diluição de isoproterenol, testamos em água, etanol e óleo. O isoproterenol na concentração de 20 mg/mL foi facilmente diluído em água e etanol, porém no óleo não foi homogeneizado, como vemos na Figura 14.

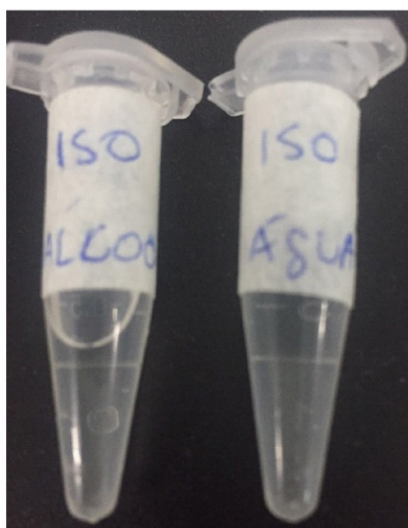
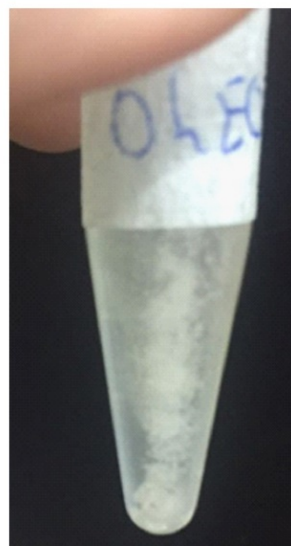
A**B**

Figura: 14: (A) isoproterenol diluído em etanol à esquerda e água destilada à direita. (B) isoproterenol diluído em óleo.

Em seguida, descartamos a diluição direta no óleo. A pequena quantidade de isoproterenol diluído em água, não homogeneizou no óleo, pela diferença de polaridade, porém o etanol diluiu facilmente no óleo de soja.

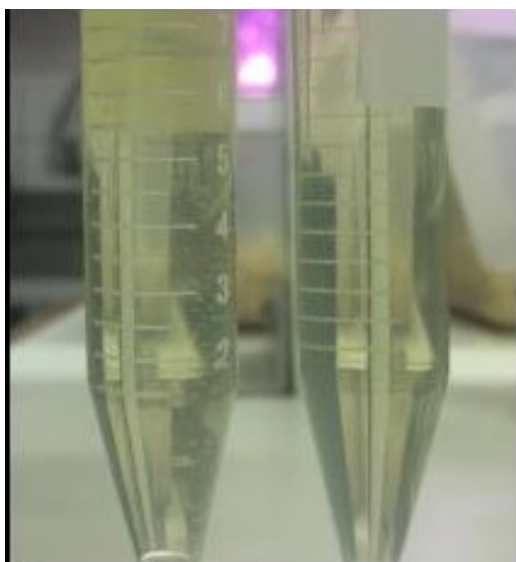


Figura: 15: Isoproterenol homogeneizado em óleo de soja, à esquerda diluído em água e à direita, diluído em etanol.

Após a definição da diluição do isoproterenol, definimos o local de aplicação no animal, via subcutânea. A princípio, a aplicação foi feita na pata do animal, atravessando o músculo da coxa e injetando no subcutâneo. Porém houve um acúmulo de óleo de soja no músculo e não causou hipertrofia cardíaca, como mostra a Figura 16.



Figura: 16: Óleo de soja acumulado formando bolha em músculo da coxa.

Em seguida, foi aplicada em dorso do animal, na região subcutânea, próximo a coluna torácica com tricotomia no local, porém ocorreu vazamento sem efeito de hipertrofia cardíaca.

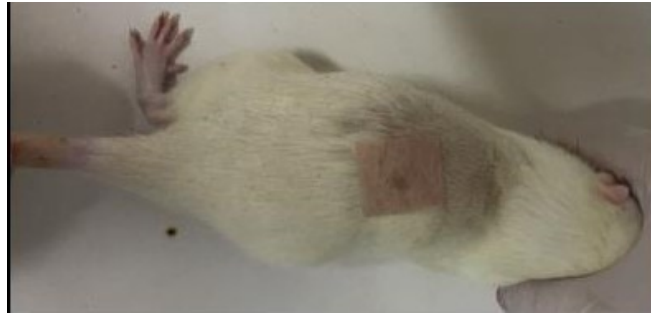


Figura: 17-A: Extravasamento do óleo de soja.

Logo após, foi injetado em dorso da nuca via subcutânea. Foi feito uma prega entre o dedo indicador e o polegar, injetado com agulha hipodérmica curta (25x7mm), passando apenas pela derme, o mais próximo da superfície, formando uma pápula após a administração da substância. A partir disso, não houve mais extravasamento e foi dado continuidade em outros experimentos.



Figura: 17-B: Administração via subcutânea em dorso da nuca.

8.2 Hipertrofia cardíaca e muscular esquelética

8.2.1 Metodologia

Os grupos CTRL 7d, VHC 7d e ISO 7d foram tratados por 7 dias consecutivos, e os grupos VHC 15d e ISO 15d foram tratados por 15 dias consecutivos. Após 24h da última dose de tratamento, os ratos foram pesados, eutanasiados com dose letal de tiopental (100 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. O coração foi removido e dissecado em ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Os músculos D (EDL- extensor longo dos dedos, sóleo, plantar e gastrocnêmio) foram removidos. Os músculos foram pesados úmidos e após 48h secos em estufa à 37°C. As tíbias foram removidas e medidas por um paquímetro em centímetros. Os pesos dos ventrículos e dos músculos esqueléticos foram corrigidos pela relação do peso corporal e pelo tamanho da tíbia. Esta relação foi utilizada como um índice de hipertrofia ventricular e do músculo esquelético.

8.2.2 Resultados

8.2.2.1 Peso úmido dos ventrículos direito e esquerdo

A figura 18 mostra o efeito do isoproterenol no coração. Nas figuras 18A (ventrículo direito), 5C (ventrículo esquerdo) 5E (peso cardíaco), observamos que o isoproterenol causou hipertrofia cardíaca em ambas as concentrações de 0,4 mg/kg e 0,8 mg/kg quando corrigido pelo peso corporal em relação aos respectivos grupos VHC; (VD: 0,4 mg/kg 7d, 28 %; 0,8 mg/kg 7d, 23 % e 0,4 mg/kg 15d, 51 %; VE: 0,4 mg/kg 7d, 25 %; 0,8 mg/kg 7d, 28 % e 0,4 mg/kg 15d, 41 %; peso cardíaco: 0,4 mg/kg 7d, 26 %; 0,8 mg/kg 7d, 28 % e 0,4 mg/kg 15d, 43 %). Nas figuras 18B (ventrículo direito), 5D (ventrículo esquerdo) e 5F (peso cardíaco), observamos que o isoproterenol causou hipertrofia cardíaca na dose de 0,4 mg/kg por 7d e 15d quando corrigidos pelo tamanho da tíbia (VD - 0,4 mg/kg 7d: 31 % e 0,4 mg/kg 15d: 42 %; VE - 0,4 mg/kg 7d: 38 % e 0,4 mg/kg 15d: 31 %; peso cardíaco - 0,4 mg/kg 7d: 37 % e 0,4 mg/kg 15d: 34 %).

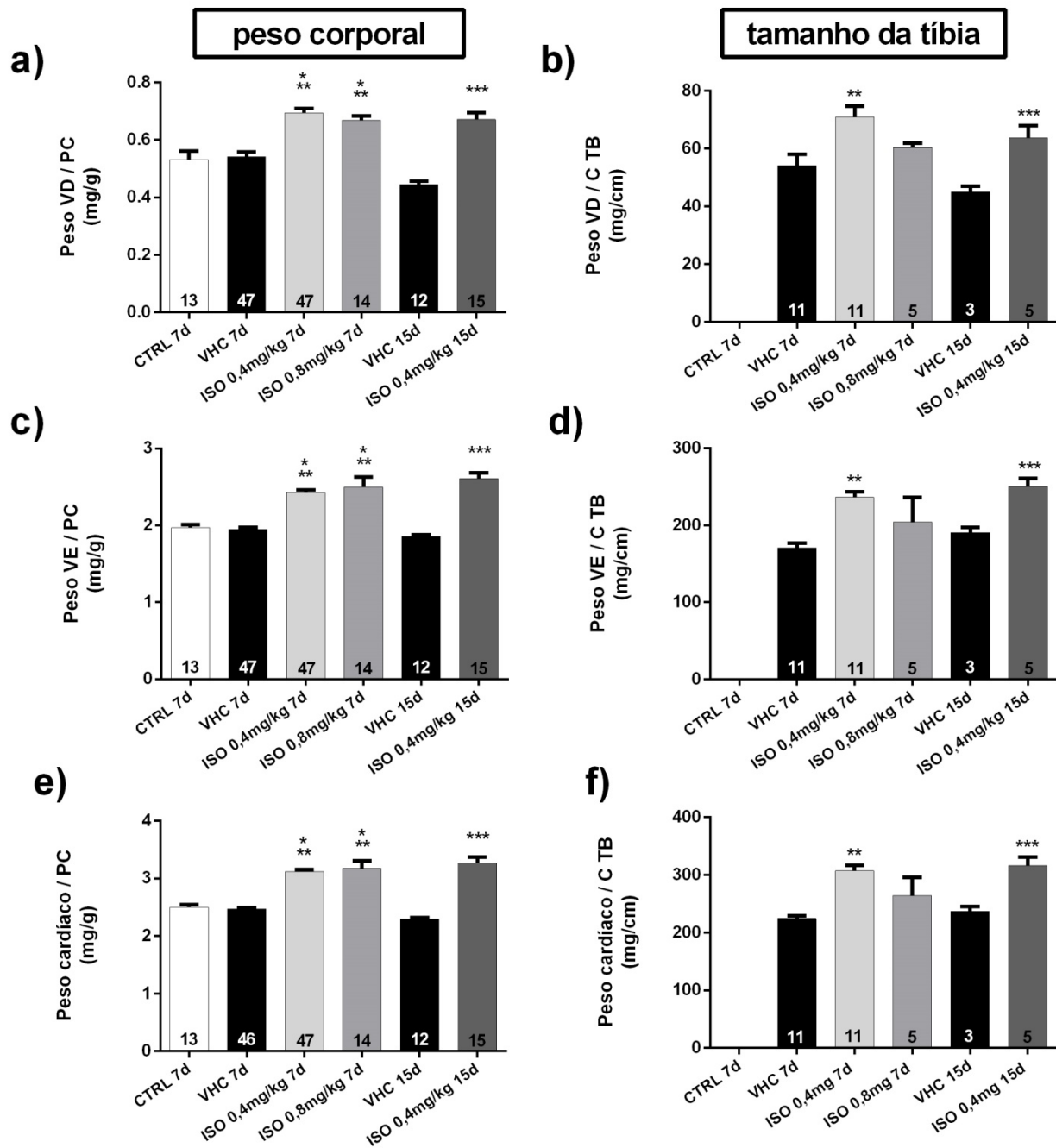


Figura 18: Peso úmido cardíaco. (A) Peso do VD corrigido pelo PC, (B) Peso do VD corrigido pelo C. TB., (C) Peso do VE corrigido pelo PC, (D) Peso do VE corrigido pelo C. TB., (E) Peso cardíaco corrigido pelo PC; (F) Peso cardíaco corrigido pelo C. TB. CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias; 15d, 15 dias; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; peso cardíaco, soma do VD com VE; PC, peso corporal; TB, comprimento da tíbia. ANOVA uma via – tratamento de 7 dias, * $p < 0,05$ ambos os grupos vs CTRL 7d, ** $p < 0,05$ ambos os grupos vs VHC 7d. Teste t de *Student* – tratamento de 15 dias, *** $p < 0,05$ ISO 0,4

mg/kg 15d vs VHC 15d. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

8.2.2.2 Peso seco dos ventrículos direito e esquerdo

Na figura 19 temos os pesos secos dos ventrículos direito e esquerdo e peso cardíaco total. Na figura 19A (ventrículo direito), 6C (ventrículo esquerdo) 6E (peso cardíaco), notamos que o isoproterenol, na dose diária de 0,4 mg/kg por 7 dias causou hipertrofia cardíaca quando corrigido pelo peso corporal em relação ao grupo VHC (VD/PC: 22 %; VE/PC: 20 %; peso cardíaco/PC: 21 %).

Observamos na figura 19B que o VD/CTB não causou hipertrofia cardíaca pelo tratamento com isoproterenol no grupo 0,4 mg/kg 7d, porém, na figura 19D e 19F, observamos hipertrofia no ventrículo esquerdo e na soma dos dois ventrículos (VE/PC: ISO 0,4 mg/kg 7d, 36 %; peso cardíaco/PC: ISO 0,4 mg/kg 7d, 32 %) após tratamento com isoproterenol.

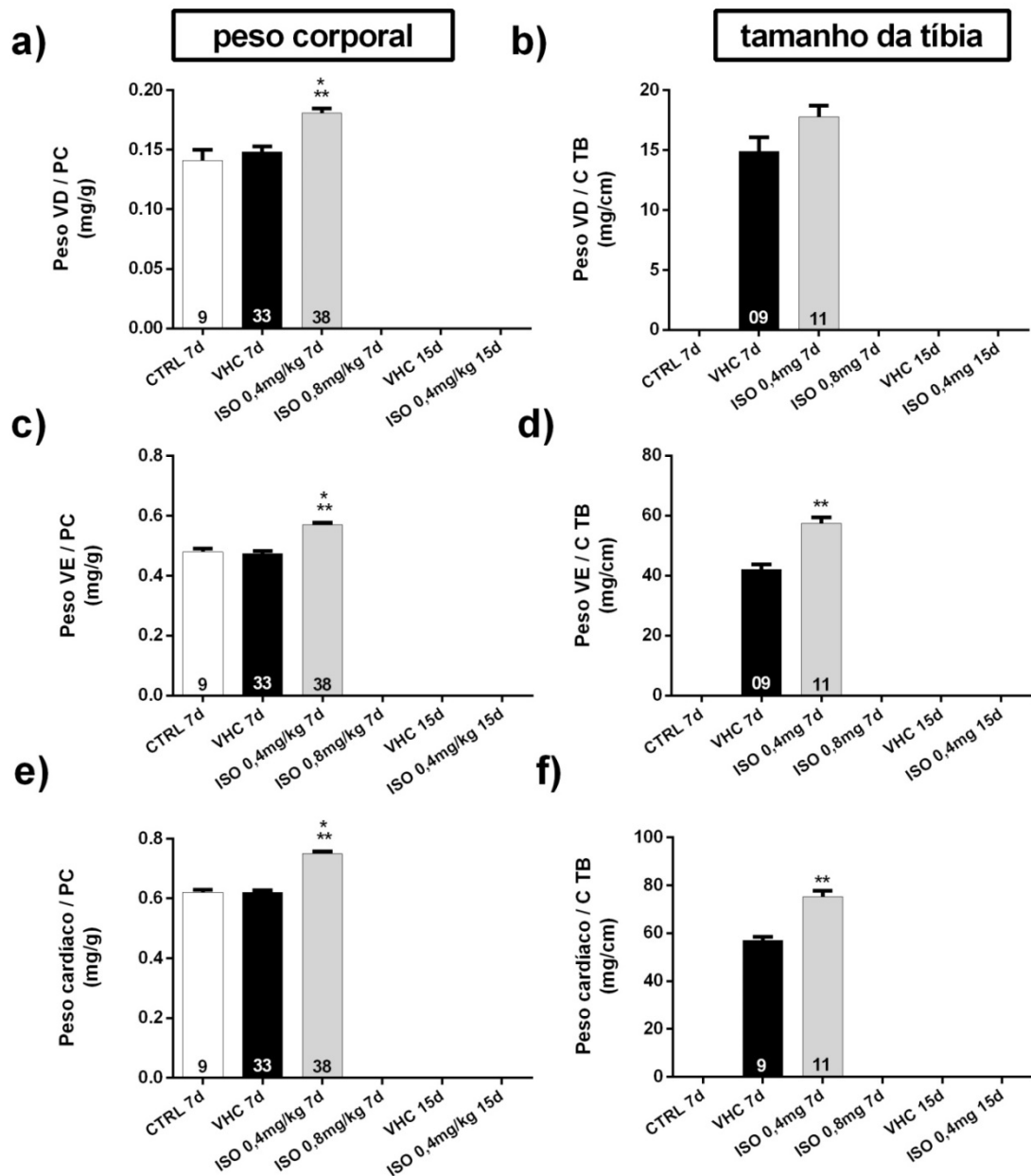


Figura 19: Peso seco cardíaco. (A) Peso do VD corrigido pelo PC, (B) Peso do VD corrigido pelo C. TB., (C) Peso do VE corrigido pelo PC, (D) Peso do VE corrigido pelo C. TB., (E) Peso cardíaco corrigido pelo PC; (F) Peso cardíaco corrigido pelo C. TB. CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias; 15d, 15 dias; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; peso cardíaco, soma do VD com VE; PC, peso corporal; TB, comprimento da tíbia. ANOVA uma via – tratamento de 7 dias, * $p < 0,05$ ISO 0,4 mg/kg 7d vs CTRL 7d, ** $p < 0,05$ ISO 0,4 mg/kg 7d vs VHC 7d. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

8.2.2.3. Peso úmido dos músculos esqueléticos

A figura 20 representa o efeito do isoproterenol sobre o peso úmido dos músculos EDL (20A e 20B), sóleo (20C e 20D), plantar (20E e 20F) e gastrocnêmio (20G e 20H), corrigidos pelo peso corporal e pelo comprimento da tibia. Observamos nas figuras 20A e 20B que o efeito crônico do isoproterenol no grupo ISO 0,4 mg/kg 7d causou hipertrofia no músculo EDL (EDL/PC: 12 %, EDL/CTB: 11 %). No músculo sóleo não houve diferença estatística entre os grupos (20C e 20D). O músculo plantar não teve diferença estatística quando corrigido pelo peso corporal (20E) e não foi avaliado pelo comprimento da tibia (20F). Na figura 20G e 20H, observamos que o músculo gastrocnêmio apresentou hipertrofia em ambos os grupos tratados com isoproterenol quando corrigidos pelo peso corporal em relação aos grupos VHC (0,4 mg/kg 7d: 8 %, 0,8 mg/kg 7d: 9 %, 0,4 mg/kg 15d: 19 %), e quando corrigidos pelo tamanho da tibia, apresentou 8 % de hipertrofia no grupo ISO 0,4 mg/kg 15d.

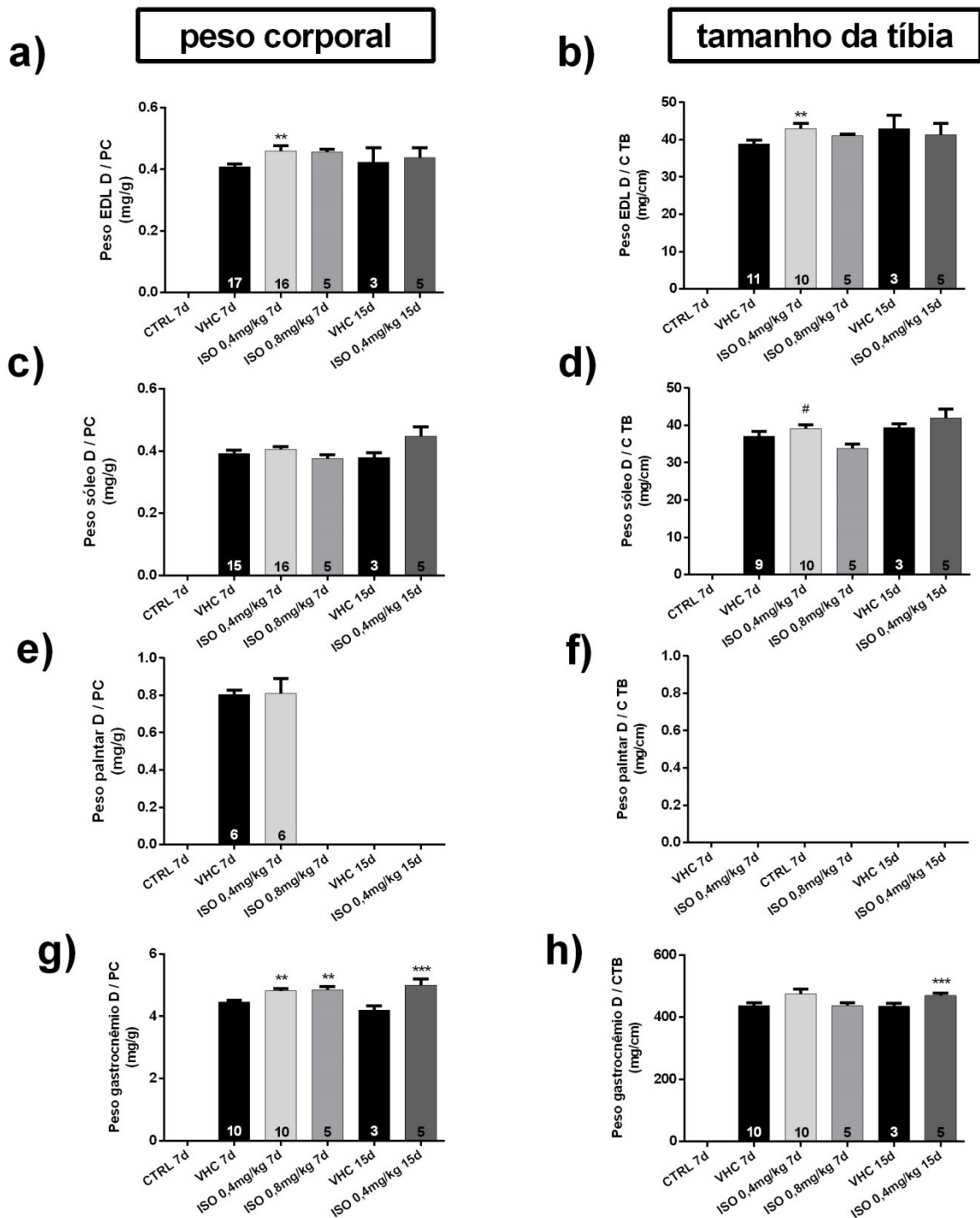


Figura 20: Peso úmido dos músculos esqueléticos. (A) EDL corrigido pelo PC, (B) EDL corrigido pelo C. TB., (C) sóleo corrigido pelo PC, (D) sóleo corrigido pelo C. TB., (E) plantar corrigido pelo PC, (F) plantar corrigido pelo C. TB., (G) gastrocnêmio corrigido pelo PC, (H) gastrocnêmio corrigido pelo C. TB. CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias; 15d, 15 dias, PC, peso corporal; TB, comprimento da tíbia, EDL- extensor longo dos dedos. ANOVA uma via – tratamento de 7 dias; Teste t de *Student* – tratamento de 15 dias; **p<0,05 ambos grupos os vs VHC 7d, ***p<0,05 ISO 0,4 mg/kg 15d vs VHC 15d, #p<0,05 ISO 0,4 mg/kg 7d vs ISO 0,8 mg/kg 7d. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

8.2.2.4 Peso seco dos músculos esqueléticos

A figura 21 está apresentando o efeito do isoproterenol sobre o peso seco dos músculos EDL (21A e 21B), sóleo (21C e 21D), plantar (21E e 21F) e gastrocnêmio (21G e 21H), corrigidos pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia. Como vemos na figura 21, ao avaliar o peso seco dos músculos esqueléticos houve hipertrofia somente no EDL (7 %) no grupo ISO 0,4 mg/kg 7d, quando relacionado pelo peso corporal (A). Nos músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 21 B, C, D, E, F, G, H).

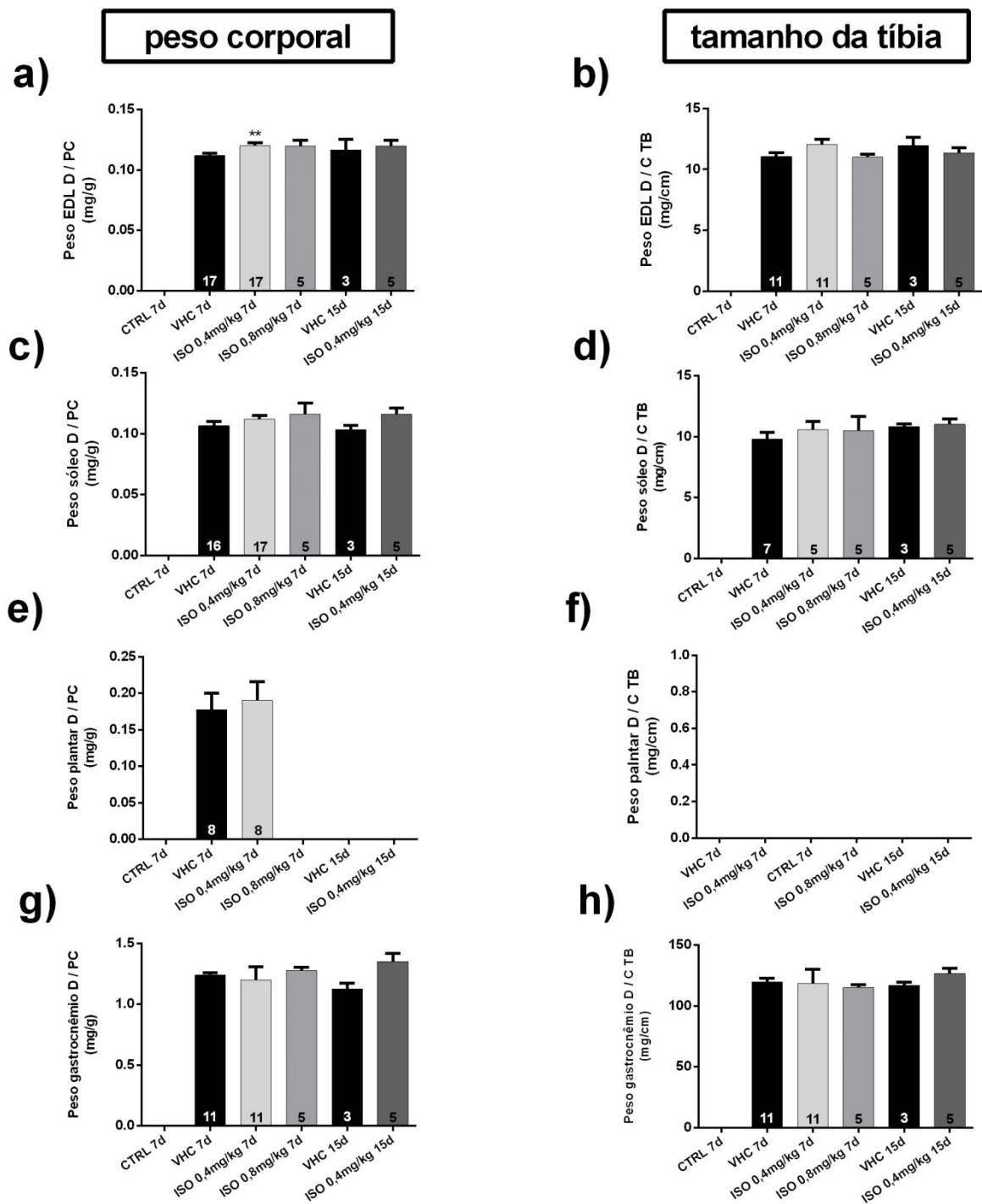


Figura 21: Peso seco dos músculos esqueléticos. (A) EDL corrigido pelo PC, (B) EDL corrigido pelo C. TB., (C) sóleo corrigido pelo PC, (D) sóleo corrigido pelo C. TB., (E) plantar corrigido pelo PC, (F) plantar corrigido pelo C. TB., (G) gastrocnêmio corrigido pelo PC, (H) gastrocnêmio corrigido pelo C. TB. CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias; 15d, 15 dias, PC, peso corporal; C TB, comprimento da tíbia, EDL- extensor longo dos dedos. ANOVA uma via – tratamento de 7 dias; Teste t de *Student* – tratamento de 15 dias; **p<0,05 ambos grupos os vs VHC 7d. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

8.3. Reatividade vascular

8.3.1 Metodologia

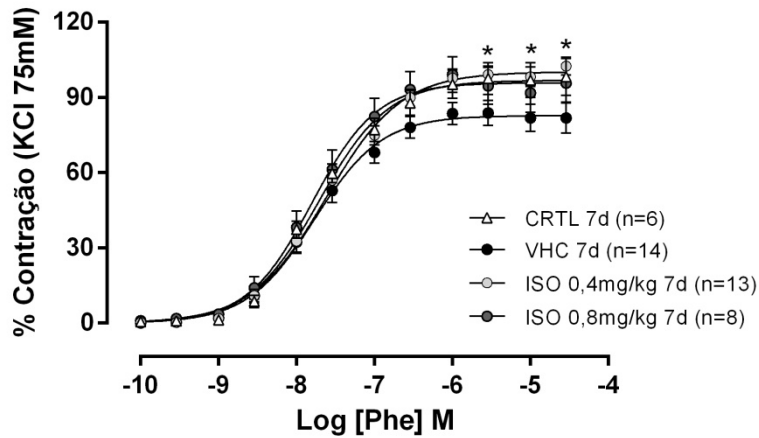
Para avaliar o efeito do isoproterenol na reatividade vascular em dose mais elevada ou com maior tempo de tratamento, foi adicionado o grupo com maior concentração de isoproterenol (ISO 0,8 mg/kg 7d) como vemos na figura 22 e um grupo com tempo de tratamento por 15 dias (ISO 0,4 mg/kg 15d) (Figura 23).

8.3.2 Resultados

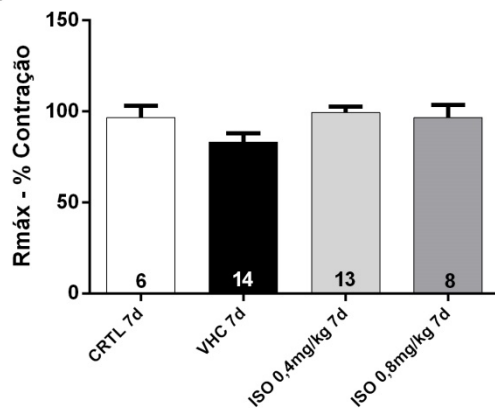
Na figura 22, observamos uma resposta contrátil aumentada no grupo ISO 0,4 mg/kg 7d em comparação ao grupo VHC 7d (Figura 22A). Apesar disso, não houve

diferença estatística na R_{máx} (Figura 22:B) e na EC₅₀ (Figura 22:C).entre os grupos

a)



b)



c)

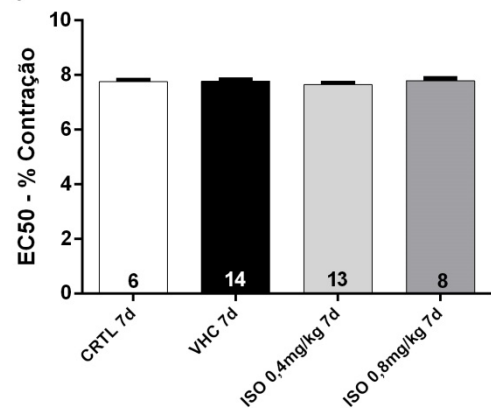


Figura 22: Reatividade vascular realizada no LEMC. (A) Curva concentração-resposta à fenilefrina. (B) Resposta máxima (R_{máx}). (C) Sensibilidade (EC₅₀). CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias. ANOVA duas vias – reatividade vascular; ANOVA uma via – R_{máx} e EC₅₀, *p<0,05 ISO 7d 0,4 mg/kg vs VHC 7d. Os valores dentro das barras e entre parênteses representam o “n” de cada grupo.

Na figura 23 temos a reatividade vascular no grupo ISO 0,4 mg/kg 15d. Não observamos diferença na curva de contração à fenilefrina (Figura 23A), na R_{máx} (Figura 23B) e na sensibilidade (Figura 23C) entre os grupos.

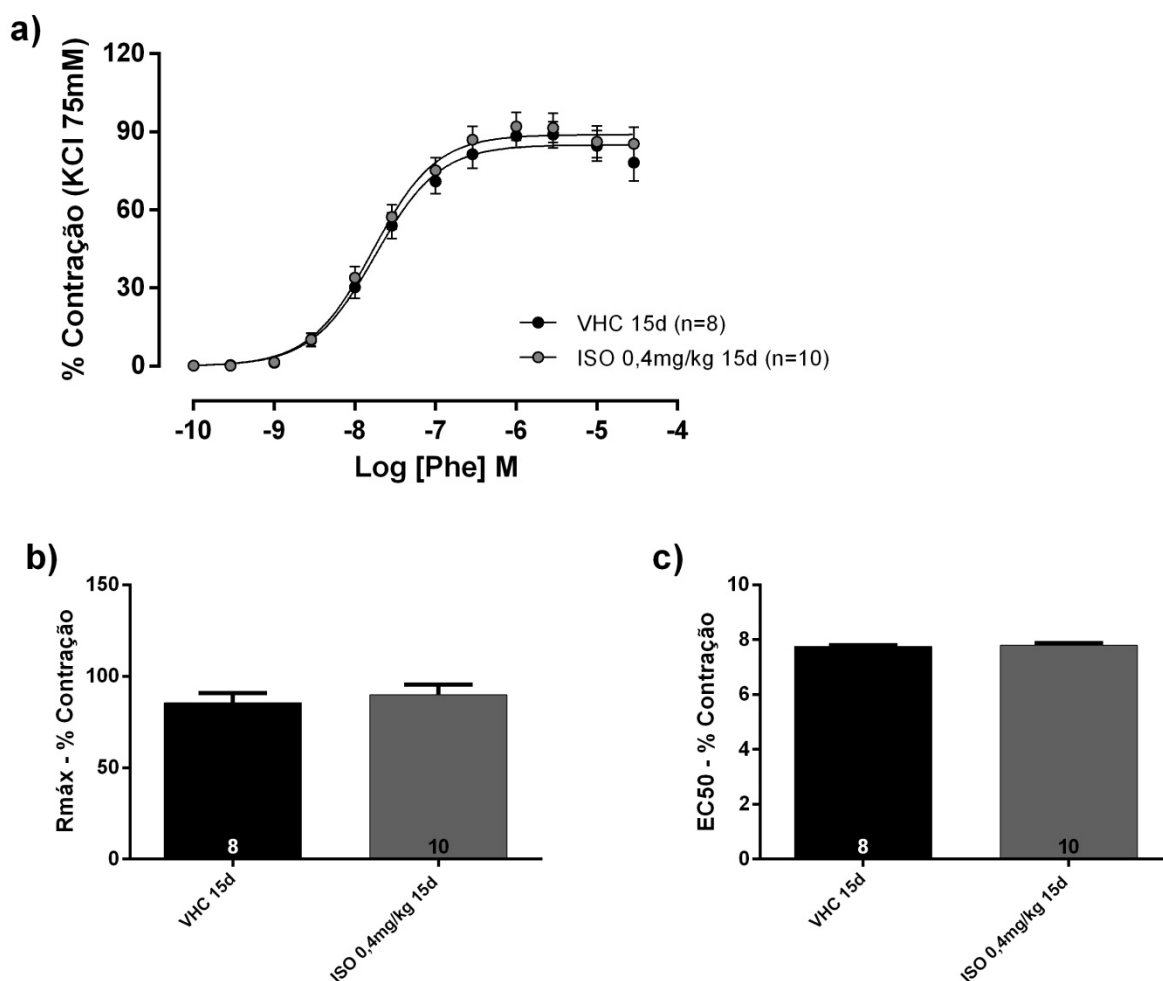


Figura 23: Reatividade vascular realiza no LEMC. (A) Curva concentração-resposta à fenilefrina. (B) Resposta máxima (Rmáx). (C) Sensibilidade (EC50). CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 15d, 15 dias. ANOVA duas vias – reatividade vascular; Teste t *Student* – Rmáx e EC50. Os valores dentro das barras e entre parênteses representam o “n” de cada grupo.

8.4. Atividade da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) *in vivo*

8.4.1 Metodologia

A artéria torácica foi removida e armazenada em -80°C para obtenção de homogenato. As aortas foram processadas e homogeneizadas em solução tampão (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM Cloreto de magnésio, 5 mM KCl, 25 mM pH 7,5 HEPES, 1 mM PMSF, 0,1 % Triton X-100) por sonificador ultrassônico de ponteira em

vatagem 10, por oito vezes durante 5 segundos em intervalos de 10 segundos em gelo. O homogenato foi centrifugado por 15 min em 1200 RCF, temperatura a 4°C e o sobrenadante foi armazenado em -80 °C. As amostras de plasma e homogenatos de aorta foram misturados cada um em aparelho agitador vórtex e pipetado 15uL de amostra com 185 ul de solução tampão de ensaio (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) mais substrato (*H-Gly-Pro-pNA · p-tosylate*, 2 mM) em cada poço na placa de 96 wells. A absorbância foi determinada em medidas duplicatas ou triplicatas utilizando um leitor de microplacas Varioskan™ (emissão 405 nm) em 37°C, 25 leituras, intervalo de 2 minutos por leitura.

8.4.2 Resultados

Na figura 24 mostramos a atividade da DPP-4 após tratamento crônico com isoproterenol. Na figura 24A observamos que houve diminuição da atividade da DPP-4 plasmática de 14 % no grupo ISO 0,8 mg/kg 7d comparado ao grupo VHC 7d.

Na figura 24B, analisamos a atividade da DPP-4 na aorta após tratamento crônico com isoproterenol. Observamos que a atividade da DPP-4 não apresentou diferença significativa entre os grupos.

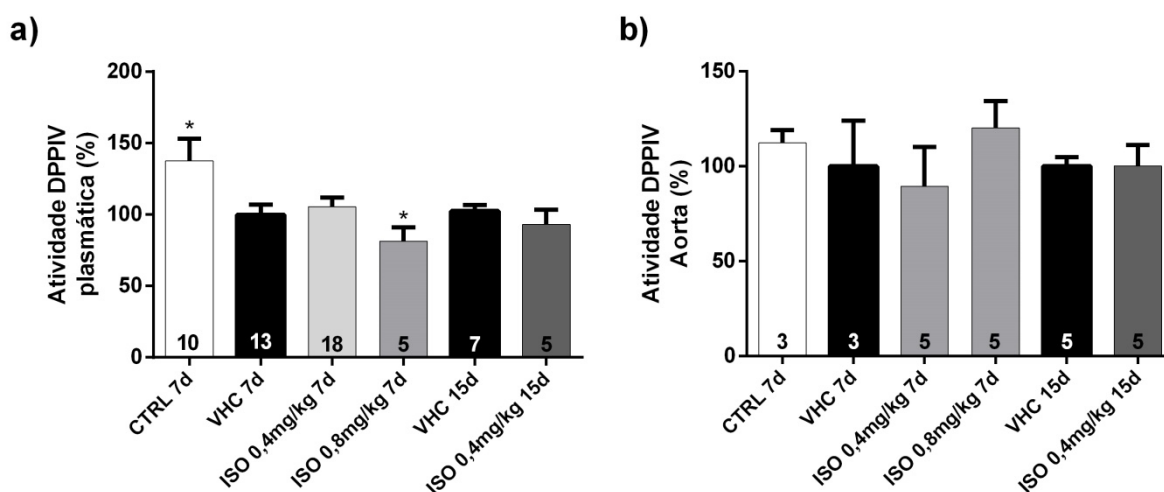


Figura 24: Atividade da DPP-4 *in vivo*. (A) Atividade plasmática. (B) Atividade na aorta. CTRL, controle; VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias; 15d, 15 dias. ANOVA uma via. * $p < 0,05$ ambos os grupos vs VHC 7d. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

8.5. Expressão Gênica de citocinas inflamatórias *in vivo*

8.5.1 Metodologia

O RNA total dos segmentos da aorta foi isolado utilizando o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. As análises de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1B, IL-6, TGF- β), quimiocina CCL2, colágeno tipo I e III foram examinadas por RT-PCR quantitativa realizadas na Universidade de São Paulo – USP.

8.5.2 Resultados

Na figura 25, observamos o efeito do tratamento com isoproterenol sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TGF- β , MCP-1) em aortas. Nas figuras 25 A e B, observamos que os grupos ISO aumentaram a expressão gênica de IL-1 β e IL-6 em relação ao VHC. Na figura 25 C, observamos que somente o grupo ISO 0,8 mg/kg 7d aumentou a expressão gênica de TGF- β em relação ao grupo VHC 7d. Na figura 25 D observamos que os grupos ISO 7d aumentaram a expressão gênica da quimiocina MCP-1 em comparação ao grupo VHC 7d, enquanto os grupos ISO 15d e VHC 15d não apresentaram diferença significativa.

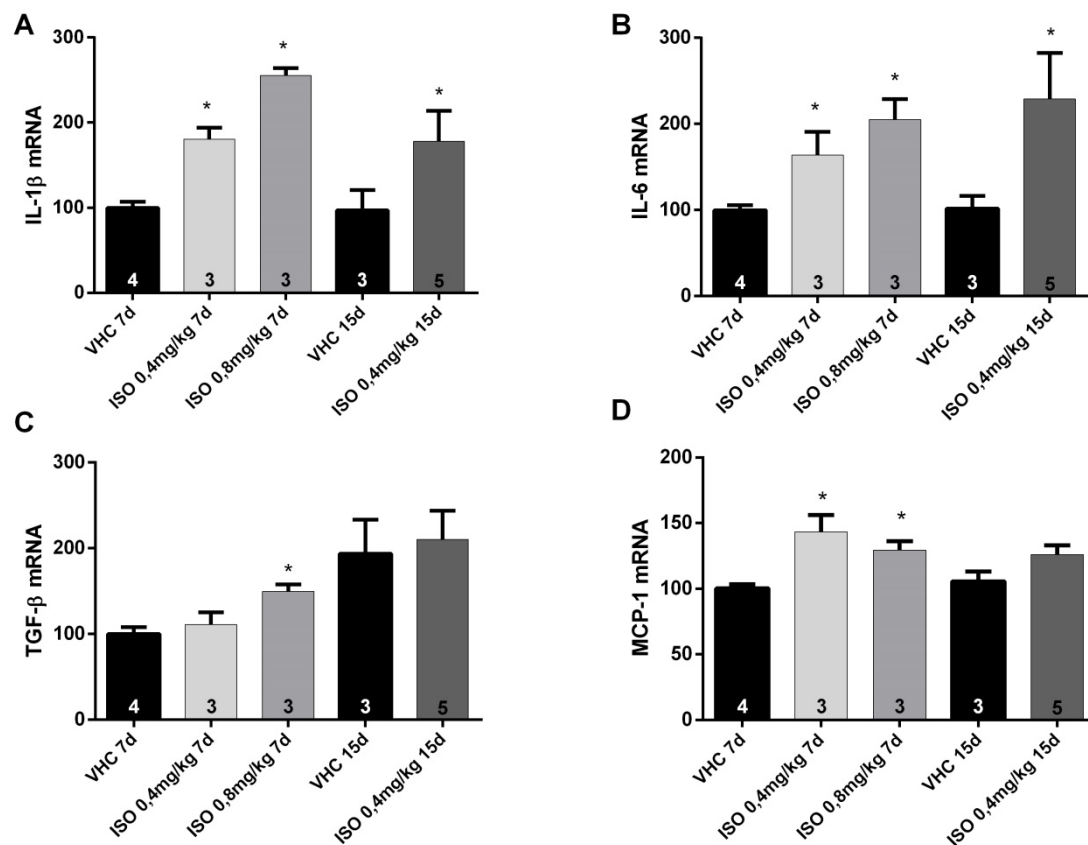


Figura 25. Expressão gênica de citocinas inflamatórias em aorta. (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TGF- β , (D) MCP-1. VHC, veículo; ISO, isoproterenol; 7d, 7 dias; 15d, 15 dias. ANOVA uma via. * $p < 0,05$ ISO vs VHC. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

Na figura 26 observamos o efeito do tratamento com isoproterenol sobre a expressão gênica de colágeno em aortas. Observamos que o grupo ISO 0,8 mg/kg 7d aumentou a expressão gênica do colágeno do tipo I (Figura 26A) em 90 % comparado ao grupo VHC 7d. Não observamos diferença da expressão de colágeno do tipo III entre os grupos (Figura 26B).

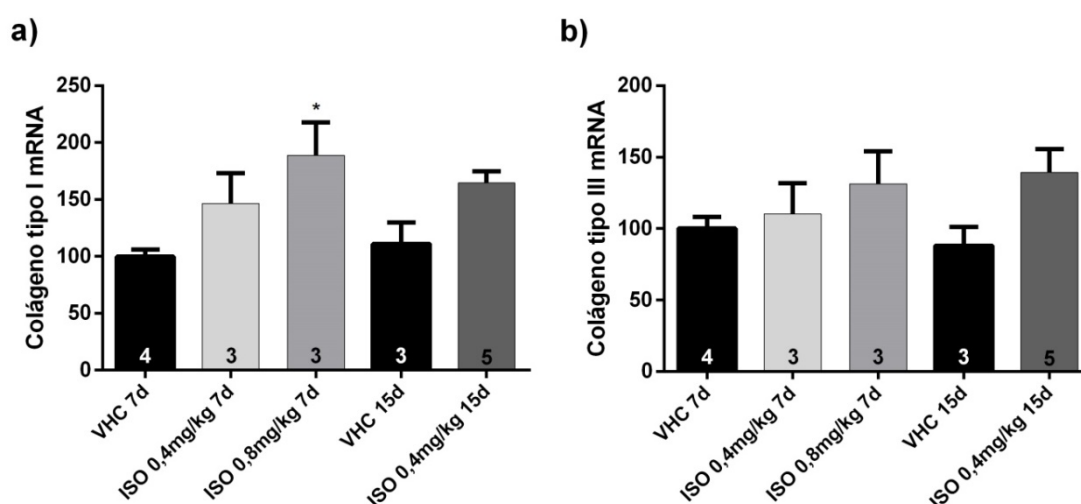


Figura 26: Expressão gênica de colágeno tipo I e III em aorta. (A) Colágeno do tipo I, (B) Colágeno do tipo III. CTRL, controle; ISO, isoproterenol; 7d, 7dias; 15d, 15 dias. Anova uma via. * $p < 0,05$ ISO 0,8 mg/kg 7d vs VHC 7d. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.

8.6. RT-PCR de colágeno

8.6.1. Metodologia

As CMLV foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/well e $1,5 \times 10^4$ células/well, respectivamente em placas de 24-well até atingirem a confluência e foram submetidas a *starving* por 3 horas, nas quais foram mantidas em meio de cultura com 0,5 % de FBS. Após a estimulação, o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. As análises de expressão gênica de colágenos do tipo I e III foi examinada por RT-PCR quantitativa realizadas na Universidade de São Paulo – USP.

8.6.2. Resultados

Na figura 27, observamos o efeito do tratamento com isoproterenol sobre a expressão gênica do colágeno *in vitro*. Não observamos diferenças estatísticas na expressão gênica de colágeno do tipo I (Figura 27A) e tipo III (Figura 27B) após estímulo com isoproterenol *in vitro*.

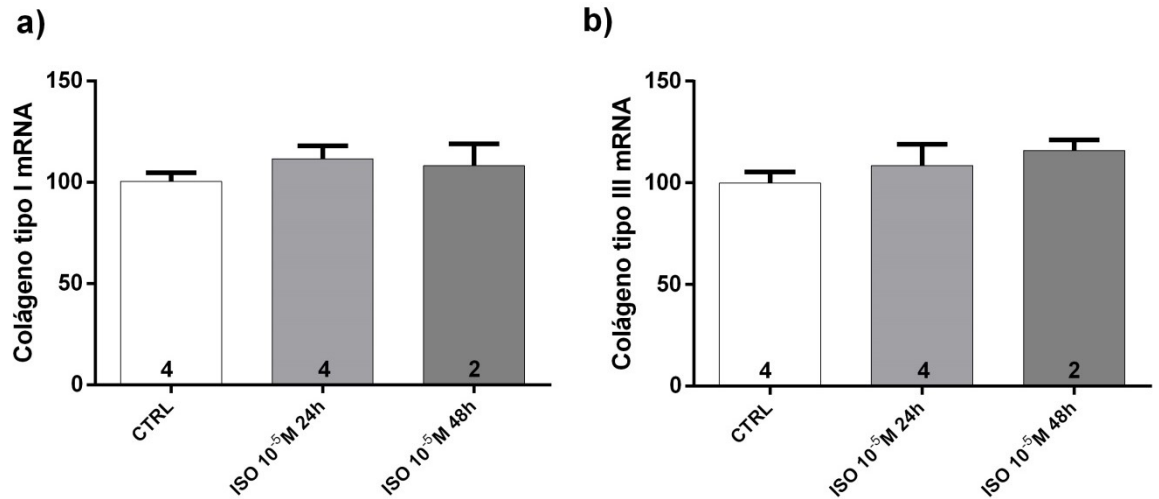


Figura 27: Expressão gênica de colágeno tipo I e III em CMLV. (A) Colágeno tipo I, (B) colágeno tipo III. CTRL, controle; ISO, isoproterenol; 24h após estímulo; 48h após estímulo. ANOVA uma via. Os valores dentro das barras representam o “n” de cada grupo.